

EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL

SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

MAY 26 '55

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

G. FODOR: Neuere Ergebnisse über die Raumstruktur der Tropanalkaloide 129

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

- A. ASCENZI and A. CHIOZZOTTO: Electron Microscopy of the Bone Ground Substance Using the Pseudo-Replica Technique 140
- M. J. DALLEMAGNE, CLAUDINE FABRY, and P. BODSON: The Exchange of Bone Calcium with Ca^{45} 142
- H. RÖCKERT: Microradiographic Studies of Teeth 143
- W. SCHREIL und F. SCHLEICH: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an lebenden Bakterien mit Hilfe des Abdruckverfahrens. 144
- H. KÖNIGSBAUER: Über die Wirkung der chronischen Colchicinvergiftung auf experimentelle Mykosen 146
- P. E. PILET et SUZANNE MEYLAN: Polarité électrique de fragments de Carotte cultivés *in vitro* 147
- R. LOUIS et W. H. SCHOPFER: Recherches sur les greffes de méristèmes de *Pisum* 149
- B. HACCIUS: Versuche zur somatischen Beeinflussung der Organbildung pflanzlicher Embryonen 149
- A. POLICARD, A. COLLET et L. GILTAIRE-RALYTE: Bordure superficielle de pseudopodes au niveau des cellules mésothéliales du revêtement péritonéal chez les mammifères 152
- MARIE DiBERARDINO: Mitotic Frequency in Normal and Regenerating Tail Tips of *Rana pipiens* Embryos 152
- H. J. ANTON: Die Regeneration heteroplastischer chimärischer Extremitäten bei *Triturus vulgaris* und *Triturus cristatus* 154
- R. FÄNGE: Use of the Isolated Heart of a Freshwater Mussel (*Anodonta cygnea* L.) for Biological Estimation of 5-hydroxytryptamine 156
- A. FABIYI: Propagation of a Virus of the Encephalomyocarditis Group in Roller Tube Cultures of Mouse Testicular Tissue 156
- J. GILLMAN, CHRISTINE GILBERT, and ISOBEL SPENCE: The Prevention of Experimentally Induced Reticulo-sarcoma by Hypothyroidism 157
- A. FORSSBERG and S. LARSSON: The "Feeding Centre" of the Hypothalamic Region of the Rat Brain 158
- R. KIMURA, S. Hotta, T. FUJII, I. TANABE, Y. HASHIMOTO, T. INOUE, and T. FUJITA: The Uptake of Radio-active Phosphorus into Phosphorus Compounds in the Brains of Virus-Infected Mice 160
- R. FISCHER: Possible Biosynthesis of D-lysergic Acid Diethylamide-like Compounds from Mescaline (Disputandum) 162
- S. BOURGHARDT, H. HYDÉN, and B. NYQUIST: A Scanning and Computing Microphotometer for Cell Analyses (Pro Laboratorio) 163
- K. V. GIRI: A Simple Paper Chromatographic Method for the Study of Serum Protein Patterns in Health and Disease (Pro Experimentis) 165

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiolum progressus: H. BIERI: Über das Hauptproblem bei konvexen Rotationskörpern 167

EXPERIENTIA



L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications*;
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées*.

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienenen *Bücher*, durch Referate über *Kongresse und Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

E X P E R .

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 36.- pour la Suisse; pour l'étranger fr. 46.-. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $\frac{1}{2}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ page fr. 77.-. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser, Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 249800; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.-, im Ausland sFr. 46.-.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 x 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ Seite Fr. 77.-; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Tel. 249800; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni*;
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports*;
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.- per la Svizzera; all'estero fr. 46.-. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 x 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $\frac{1}{2}$ pag. fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ pag. fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ pag. fr. 77.-; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Svizzera.

Casa editrice Birkhäuser, Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 249800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 36.-; other countries fr. 46.-. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 x 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $\frac{1}{2}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 249800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / Birkhäuser AG., Basel

Verzeichnis der Inserenten - Liste des annonceurs - List of Advertisers - Experientia XI/4

Barbier, Benard & Turenne, Paris

Birkhäuser Verlag, Basel

Ciba AG., Basel

Ganz & Co., Zürich

Publicitas, Genève

Sandoz AG., Basel

BBT

KRAUSS

Präzisionsinstrumente

Grosses Universal-Mikroskop
Monokulare und binokulare
biologische Mikroskope
Phasenkontrast-Mikroskop
Interferenz-Mikroskop
Binokulares stereoskopisches
Mikroskop
Mikrophotographische Apparate

Andere Erzeugnisse

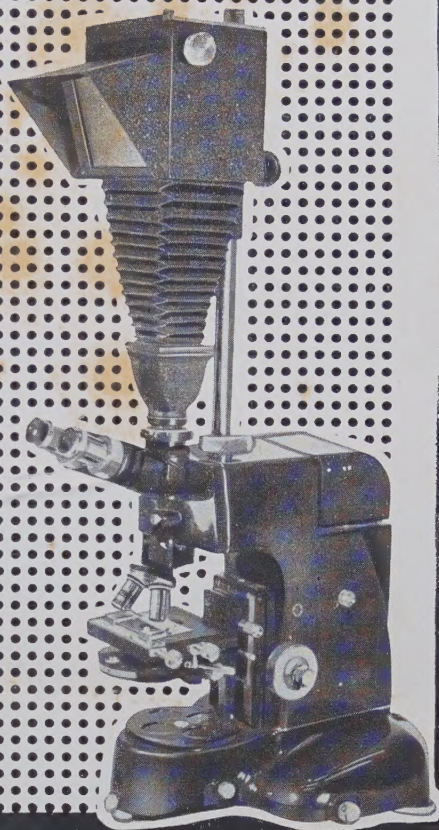
Prismengläser - Lupen -
Operationslampen - Kolposkop

Instruments de précision

Grand microscope universel
Microscopes biologiques
(Monoculaire et Binoculaire)
Microscope à
«contrast de phase»
Microscope interférentiel
Microscope binoculaire
stéréoscopique
Dispositif binoculaire de
microphotographie

Autres fabrications :

Jumelles - loupes de précision -
scialytique - colposcope



ANCIENS
ÉTABLISSEMENTS

BARBIER, BENARD & TURENNE

82, RUE CURIAL PARIS-19*

EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM I

Gegenwartsprobleme der Ernährungsforschung

Present Problems in Nutrition Research

Les problèmes actuels de la nutrition

SYMPOSIUM BASEL, 1.-4. X. 1952

Unter dem Patronat der Internationalen Union der Ernährungswissenschaften – Under the auspices of the International Union of Nutrition Sciences – Sous le patronage de l'Union internationale des sciences de la nutrition – Direction: F. Verzár – Organisation: Experientia

Beiträge: E. ABRAMSON, W. R. AYKROYD, K. BERNHARD, A. B. L. BEZNÁK, E. J. BIGWOOD, H. D. CREMER, D. P. CUTHBERTSON, H. DAM, V. DEMOLE, S. J. FOLLEY, L. J. HARRIS, O. HÖGL, K. LANG, K. THOMAS, J. TRÉMOLIÈRES, A. G. VAN VEEN, A. I. VIRTANEN, H. KRAUT, J. KÜHNAU, S. MARKEES, T. H. MOORE, A. SCHÜRCH, J. C. SOMOGYI, F. TERROINE etc.

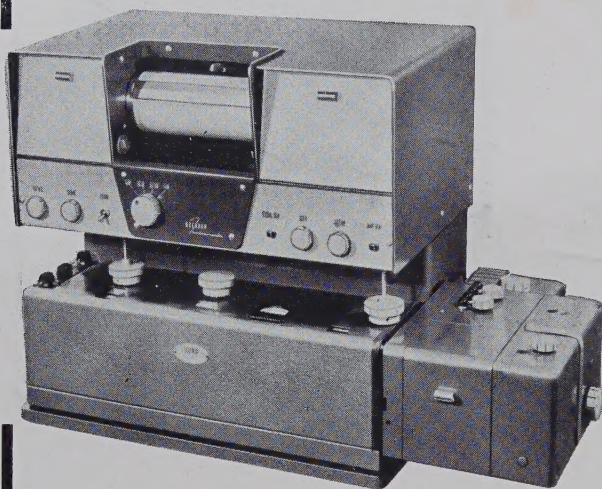
Ganzleinenband - Full cloth - Relié en toile - (1953) - 312 Seiten. Fr. 32.— (DM 32.—)

VERLAG BIRKHÄUSER · BASEL/STUTTGART

Neu!

BECKMAN- MODELL DR

**Automatik-Zusatz zum
Quarz-Spektralphotometer
Modell DU**



- Mißt und registriert vollautomatisch die Transmission von 1-3 Proben
- Aufzeichnung der Resultate in 3 verschiedenen Farben
- Wellenlängenbereich: 220 m μ bis 1000 m μ
- Meßgeschwindigkeit pro eingestellte Wellenlänge: 12 Sekunden für 3 Proben
- Volle Ausnützung der hohen DU-Präzision
- Automatische Spalteinstellung für optimale Auflösung
- Äußerst einfache Handhabung

Bitte verlangen Sie das BECKMAN-Bulletin 339/E

Auskünfte, Beratung und Angebote durch

GANZ & CO.
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73 *Zürich*



Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeklebt und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, daß einzelne Hefte im Laufe des Jahres verloren gehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

BESTELLSCHEIN

An den VERLAG BIRKHÄUSER AG., BASEL 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name:

Vorname:

Ort:

Straße:

Bitte in Blockschrift schreiben

Demandé pour laboratoire de microanalyse organique d'une importante industrie de Suisse romande, pour seconder l'analyste en fonction:

**laborant
ou laborantine**

Faire offre manuscrite avec références et photographie sous chiffre T. 4283 X Publicitas Genève

EXPERIENTIA

Vol. I - X (1945-1954)

Nach Nachdruck zahlreicher Nummern sind nun wieder alle Jahrgänge erhältlich. Vol. I kann zur Zeit nicht einzeln abgegeben werden, doch kommen auch von diesem Band im Laufe der nächsten Monate einige Hefte zum Nachdruck.

Preis von Vol. I (nur 9 Hefte) Fr. 34,50
Preis von Vol. II-X (je 12 Hefte)
pro Band Fr. 46.-

Zu beziehen durch die Buchhandlungen

BBT

KRAUSS

Präzisionsinstrumente

Grosses Universal-Mikroskop
Monokulare und binokulare
biologische Mikroskope
Phasenkontrast-Mikroskop
Interferenz-Mikroskop
Binokulares stereoskopisches
Mikroskop
Mikrophotographische Apparate

Andere Erzeugnisse

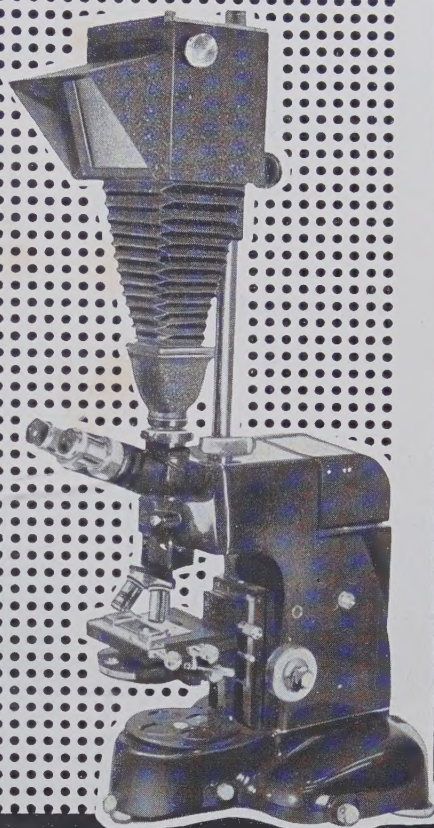
Prismengläser - Lupen -
Operationslampen - Kolposkop

Instruments de précision

Grand microscope universel
Microscopes biologiques
(Monoculaire et Binoculaire)
Microscope à
«contrast de phase»
Microscope interférentiel
Microscope binoculaire
stéréoscopique
Dispositif binoculaire de
microphotographie

Autres fabrications :

Jumelles - loupes de précision -
scialytique - colposcope



ANCIENS
ETABLISSEMENTS

BARBIER, BENARD & TURENNE

82, RUE CURIAL PARIS-19'

EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM I

Gegenwartsprobleme der Ernährungsforschung Present Problems in Nutrition Research Les problèmes actuels de la nutrition

SYMPOSIUM BASEL, 1.-4. X. 1952

Unter dem Patronat der Internationalen Union der Ernährungswissenschaften - Under the auspices of the International Union of Nutrition Sciences - Sous le patronage de l'Union internationale des sciences de la nutrition - Direction: F. Verzár - Organisation: Experientia

Beiträge: E. ABRAMSON, W. R. AYKROYD, K. BERNHARD, A. B. L. BEZNÁK, E. J. BIGWOOD, H. D. CREMER, D. P. CUTHBERTSON, H. DAM, V. DEMOLE, S. J. FOLLEY, L. J. HARRIS, O. HÖGL, K. LANG, K. THOMAS, J. TRÉMOLIÈRES, A. G. VAN VEEN, A. I. VIRTANEN, H. KRAUT, J. KÜHNAU, S. MARKEES, T. H. MOORE, A. SCHÜRCH, J. C. SOMOGYI, F. TERROINE etc.

Ganzleinenband - Full cloth - Relié en toile - (1953) - 312 Seiten. Fr. 32.- (DM 32.-)

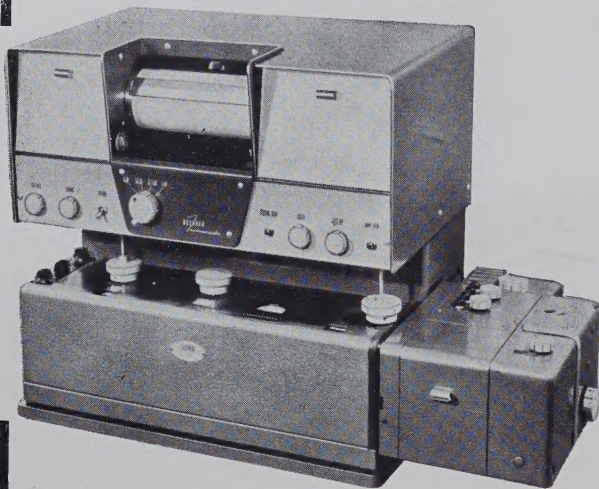
VERLAG BIRKHÄUSER · BASEL/STUTTGART

Neu!

BECKMAN-

MODELL **DR**

Automatik-Zusatz zum
Quarz-Spektralphotometer
Modell DU



- Mißt und registriert vollautomatisch die Transmission von 1-3 Proben
- Aufzeichnung der Resultate in 3 verschiedenen Farben
- Wellenlängenbereich: 220 m μ bis 1000 m μ
- Meßgeschwindigkeit pro eingestellte Wellenlänge: 12 Sekunden für 3 Proben
- Volle Ausnützung der hohen DU-Präzision
- Automatische Spalteinstellung für optimale Auflösung
- Äußerst einfache Handhabung

Bitte verlangen Sie das BECKMAN-Bulletin 339/E

Auskünfte, Beratung und Angebote durch

GANZ & Co.

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich



Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeklebt und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, daß einzelne Hefte im Laufe des Jahres verloren gehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

BESTELLSCHEIN

An den VERLAG BIRKHÄUSER AG., BASEL 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: _____

Vorname: _____

Ort: _____

Straße: _____

Bitte in Blockschrift schreiben

Demandé pour laboratoire de microanalyse organique d'une importante industrie de Suisse romande, pour seconder l'analyste en fonction:

**laborant
ou laborantine**

Faire offre manuscrite avec références et photographie sous chiffre T. 4283 X Publicitas Genève

EXPERIENTIA

Vol. I - X (1945-1954)

Nach Nachdruck zahlreicher Nummern sind nun wieder alle Jahrgänge erhältlich. Vol. I kann zur Zeit nicht einzeln abgegeben werden, doch kommen auch von diesem Band im Laufe der nächsten Monate einige Hefte zum Nachdruck.

Preis von Vol. I (nur 9 Hefte) Fr. 34.50

Preis von Vol. II-X (je 12 Hefte)
pro Band Fr. 46.-

Zu beziehen durch die Buchhandlungen

Neuere Ergebnisse über die Raumstruktur der Tropanalkaloide

Von G. FODOR, Szeged¹

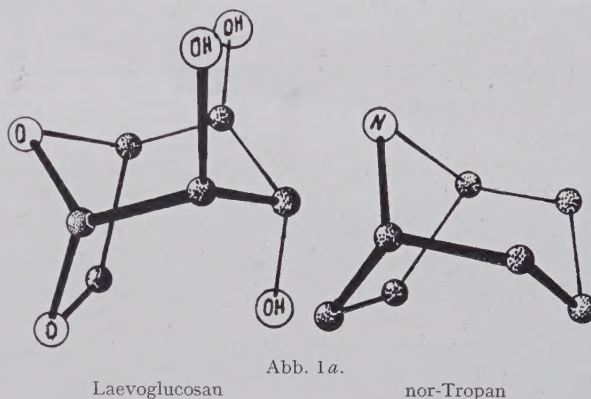
Einleitung

Die ausgeprägten und mannigfaltigen physiologischen Wirkungen (mydriatische, anästhetische, zentralnervöse usw.) der Alkaloide der *Convolvulaceae*, *Solanaceae*, *Dioscoraceae* und *Erythroxylaceae* erweckten schon früh reges Interesse für ihre chemische Konstitution. Die ersten Untersuchungen dieser Art stammen, angefangen um 1830, von LIEBIG, WÖHLER, LOSSEN, LADENBURG, EINHORN u. a. Die endgültige Aufklärung ihrer Konstitution ist jedoch den Arbeiten RICHARD WILLSTÄTTERS zu verdanken². Die Konstitutionsermittlung der den meisten Tropanalkaloiden zugrunde liegenden Alkaminkomponenten Tropin und ψ -Tropin³ wie auch des Kokains⁴ wurde 1923 durch die Totalsynthesen dieser wichtigen Verbindungen gekrönt. Gleichzeitig erfolgte⁵ auch die Konstitutionsaufklärung des Scopolamins durch KING, HESSE, SCHMIDT und WILLSTÄTTER⁶. Abgesehen von der Struktur des Valeroidins⁷, des Poroidins und der konstitutionsbeweisenden Synthese des Teloidins⁸ waren die Konstitutionsformeln der wichtigsten Tropanverbindungen demnach schon 1924 bekannt⁵, ohne dass indessen die Raumstruktur dieser interessanten Körperklasse vollständig aufgeklärt wurde. Dies war dem Mangel sowohl an entsprechenden Arbeitsmethoden als auch an stereochemischen Regeln deduktiver Art zuzuschreiben, obwohl die Beobachtung der optischen Aktivität zahlreicher Tropanalkaloide die Frage nach der räumlichen Anordnung in diesen Wirkstoffen schon früh aufwarf.

Frühere Untersuchungen

Das *nor*-Tropan stellt als Ringsystem das 1-Monoaza-[2,3,1]-bicyclooctan dar; es sei darauf hingewiesen,

dass die äusserst stabilen destillierbaren Zersetzungsprodukte zahlreicher Polysaccharide und β -Glykoside, die 1,6-Anhydro-hexopyranoside vom Typ des Laevoglucosans, morphologisch dasselbe Ringsystem, das Dioxo-bicyclo-[2,3,1]-octan, enthalten. Obwohl der Fünfring in diesem Brückensystem verzerrt sein muss, zeigen diese bizyklischen Verbindungen eine auffallende Stabilität (Abb. 1). Die natürlichen Tropan-



alkaloide enthalten jeweils veresterte, seltener epoxylierte oder freie alkoholische Hydroxylgruppen, die Ecgonine ausserdem eine Carboxylgruppe, die in den Kokainen mit Methanol verestert ist. Der Stickstoff ist in den meisten Fällen tertiär, manchmal aber auch sekundär.

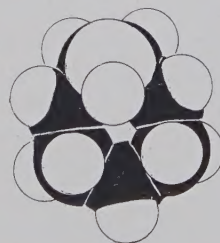


Abb. 1b. *nor*-Tropan aus Kalotten nach STUART-BRIGLEB.

Da eine 3-ständige Hydroxylgruppe in die Symmetrieebene des Ringes fällt, so kommen zwei *cis-trans*-isomere, optisch inaktive Alkohole, wie Tropin und ψ -Tropin, zustande, deren Verhältnis zueinander schon WILLSTÄTTER¹ festgestellt hat. Das 3,6,7-Trioxytropan, die Alkaminkomponente des Meteloidins, stellt ebenfalls ein symmetrisches Gebilde dar.

¹ R. WILLSTÄTTER, Ber. dtsch. chem. Ges. 29, 393, 936, 939 (1896).
- R. WILLSTÄTTER und F. IGLAUER, Ber. dtsch. chem. Ges. 33, 1170 (1900).

² R. ROBINSON, Willstätter Memorial Lecture, London, 6. November 1952; J. Chem. Soc. 1953, 999.
³ R. WILLSTÄTTER, Ber. dtsch. chem. Ges. 29, 393, 936, 939 (1896).
- R. WILLSTÄTTER und F. IGLAUER, Ber. dtsch. chem. Ges. 33, 1170 (1900).
⁴ R. WILLSTÄTTER und A. BODE, Ber. dtsch. chem. Ges. 33, 416 (1900); Liebigs Ann. Chem. 326, 46 (1902). - R. WILLSTÄTTER und M. BOMMER, Liebigs Ann. Chem. 422, 18 (1921).
⁵ Bezüglich Einzelheiten siehe die ausführliche Monographie von R. H. F. MANSKE und H. L. HOLMES, *The Alkaloids*, I. Band (Academic Press, New York 1950), S. 271-369.
⁶ R. ROBINSON, J. Chem. Soc. 111, 876 (1917).
⁷ W. M. MITCHELL und B. H. TRAUTNER, J. Chem. Soc. 1330 (1947).
⁸ CL. SCHÖPF, H. ARNOLD, Angew. Chem. 50, 783 und 803, Fussnote (1937).

Eines der zentralen Probleme der Stereochemie besteht in der Bestimmung der gegenseitigen Lage zweier oder mehrerer Atomgruppen im selben Molekül. In den Tropanalkaloiden blieb zum Beispiel die Lage der funktionellen Gruppen (OH, COOH usw.) zum Ringstickstoffatom und zueinander bis vor kurzem unbekannt¹. Zum Beispiel wusste man schon, dass sich Tropin durch Natriumamylat in das stereoisomere Pseudotropin verwandeln lässt, wobei sich nur die Lage der 3-ständigen Hydroxylgruppe ändert; es blieb jedoch unbekannt, in welchem von beiden Stoffen die OH-Gruppe dem Stickstoff benachbart ist. Die Umwandlung des Ecgonins durch Kalilauge in ψ -Ecgonin veranlasste WILLSTÄTTER, ein ähnliches Isomerieverhältnis wie von Tropin zu ψ -Tropin anzunehmen, ohne aber die räumliche Lage der OH- oder COOH-Gruppe dieser Stoffe angeben zu können. 1941 gelang es MITCHELL, durch oxydativen Abbau des Valeroidins (Isovaleroyl-3,6-dioxytropan) eine Verbindung zu isolieren², deren Analysendaten der Struktur eines zyklischen Urethans entsprachen; hiedurch ist die räumliche Nähe der freien OH-Gruppe zum Ring-N-Atom bewiesen, ohne aber daraus auf die C-3- oder C-6-Stellung dieser Funktion schliessen zu können. Die Totalsynthese des Teloidins (3,6,7-Trioxytropan) aus Mesoweinsäuredialdehyd³ legte die *cis*-Lage der beiden an C-6 und C-7 haftenden OH-Gruppen zueinander fest, ihre Stellung zum Stickstoff blieb jedoch mangels entsprechender Methoden unbestimmt.

In Kenntnis obiger Teilergebnisse wurde in unserem Institut⁴ die Bestimmung der Konfiguration der wichtigsten Tropanalkaloide vorgenommen. Dies schien uns nicht bloss aus stereochemischen Gründen wünschenswert, sondern auch weil die sterische Lage der Hydroxylgruppen am Tropanring die physiologische Wirkung in wesentlichem Masse beeinflusst. Die Kenntnis der reellen, räumlichen Molekularstruktur würde folglich zum besseren Verständnis der Bindung und Wirkungsweise der einzelnen Wirkstoffe an den verschiedenen Rezeptoren beitragen.

Die Acylwanderungsmethode

Die am meisten befriedigenden Feststellungen bezüglich der gegenseitigen räumlichen Lage zweier Atomgruppen im selben Molekül stammen aus Ringschlussreaktionen. Derartige stereospezifische Umwandlungen verlaufen positiv bei *cis*- und negativ bei *trans*-ständigen Gruppen. Diese klassische Methode konnte unlängst von uns durch die Anwendung der Acylwanderungsreaktionen ergänzt und weiterentwickelt werden. Als Zwischenprodukte in dem schon seit

Jahrzehnten bekannten Vorgang¹ wurden früher Ringe vom Oxazolin-¹ bzw. μ -Oxy-oxazolidin-Typ² vermutet. Falls nun das Zwischenprodukt der Reaktion tatsächlich ringförmig ist – sei es ein «transition state» oder ein Verbindungsindividuum –, so ist seine Bildung durch die sterische Anordnung der beiden funktionellen Gruppen (NH und OH) bedingt. Diese vorübergehende Brückenbildung zwischen NH- und OH-Gruppen im selben Molekül stellt folglich eine neue Möglichkeit zum Beweis ihrer *cis*-Stellung dar; erfolgt die Acylwanderung nicht, so ist das ein Hinweis auf *trans*-Stellung. Die Richtigkeit dieser Annahme konnte an Hand von epimeren Aminoalkoholen verschiedenster Kohlenstoffskelette überprüft und zur allgemeinen Methode der Konfigurationsbestimmungen entwickelt werden³. Auf diese Weise liess sich die Raumstruktur (Konstellation) von Ephedrin und ψ -Ephedrin⁴, Chloromycetin⁵, die Konfiguration der epimeren 2-Aminocyclohexanol⁶, Inosamine⁷, 2-Amino-borneole⁸, neuesten auch von Amino-desoxy-zucker⁹, und die der epimeren 2-Amino-3-tetralinole¹⁰ feststellen.

Für die Zwischenprodukte wird in allen Fällen die Struktur von Orthosäure-ester-amiden (II; X = H) angenommen; dafür spricht einerseits die Laugelöslichkeit von O-Benzoyl-2-amino-cyclohexanol-Base und darauffolgende Ausscheidung des N-Benzoyl-Derivates⁶, andererseits die Synthese eines Modells dieser Art¹⁰ aus dl-*trans*-3,4-Dimethyl-5-phenyl-2-oxazolidon (IV) mit Phenylmagnesiumbromid; das gemischte Mg-Salz II (X = MgBr) verhielt sich so, wie man es von den Zwischenprodukten der Acylwanderung erwarten musste: mit Säure lieferte es O-Acyl-, mit Lauge N-Acyl-Derivate (Abb. 2).

Die Konfiguration von Tropin und ψ -Tropin

Die Bestimmung der Lage der OH-Gruppe im Epimerenpaar Tropin und ψ -Tropin wurde lange Zeit durch Ringschlussreaktionen und durch Ausmessung verschiedener physikalischer Daten vergeblich gesucht. Die grössere Verseifungsgeschwindigkeit der ψ -Tropinester im Vergleich zu derjenigen der Tropinester ver-

¹ R. WILLSTÄTTER und A. BODE, Ber. dtsch. chem. Ges. 33, 416 (1900); Liebigs Ann. Chem. 326, 46 (1902). – R. WILLSTÄTTER und M. BOMMER, Liebigs Ann. Chem. 422, 18 (1921).

² Wm. M. MITCHELL und B. H. TRAUTNER, J. Chem. Soc. 1330 (1947).

³ CL. SCHÖPF und H. ARNOLD, Liebigs Ann. Chem. 558, 109 (1947).

⁴ Institut für organische Chemie, Universität Szeged.

¹ M. BERGMANN und H. BRAND, Ber. dtsch. chem. Ges. 56, 1280 (1923).

² A. P. PHILLIPS und R. BALTZLY, J. Amer. Chem. Soc. 69, 128 (1947).

³ G. FODOR und J. KISS, Nature 163, 287 (1949); 164, 917 (1949); J. Org. Chem. 14, 337 (1949).

⁴ G. FODOR, J. KISS und I. SALLAY, Nature 167, 690 (1951); J. Chem. Soc. 1858 (1951).

⁵ G. FODOR und J. KISS, J. Amer. Chem. Soc. 72, 3495 (1950); Acta Chim. Acad. Sci. Hungar. 1, 136 (1951); Research 4, 339 (1951); J. Chem. Soc. 1952, 1589.

⁶ G. E. McCASLAND, J. Amer. Chem. Soc. 73, 2295 (1951).

⁷ E. E. VAN TAMELEN und Mitarbeiter, J. Amer. Chem. Soc. 75, 1297 (1953).

⁸ G. FODOR und L. ÖTVÖS, Acta Chim. Acad. Sci. Hungar. 5, 205 (1954).

⁹ J. KISS und J. KÓBOR, Vegyipari Kut. Int. Közl. 4, 293 (1954); Acta Chim. Acad. Sci. Hungar. (im Druck).

¹⁰ Vortrag von G. FODOR an der Winterversammlung der Schweiz. chem. Ges. in Zürich, 28. Febr. 1954, Chimia 8, 179 (1954).

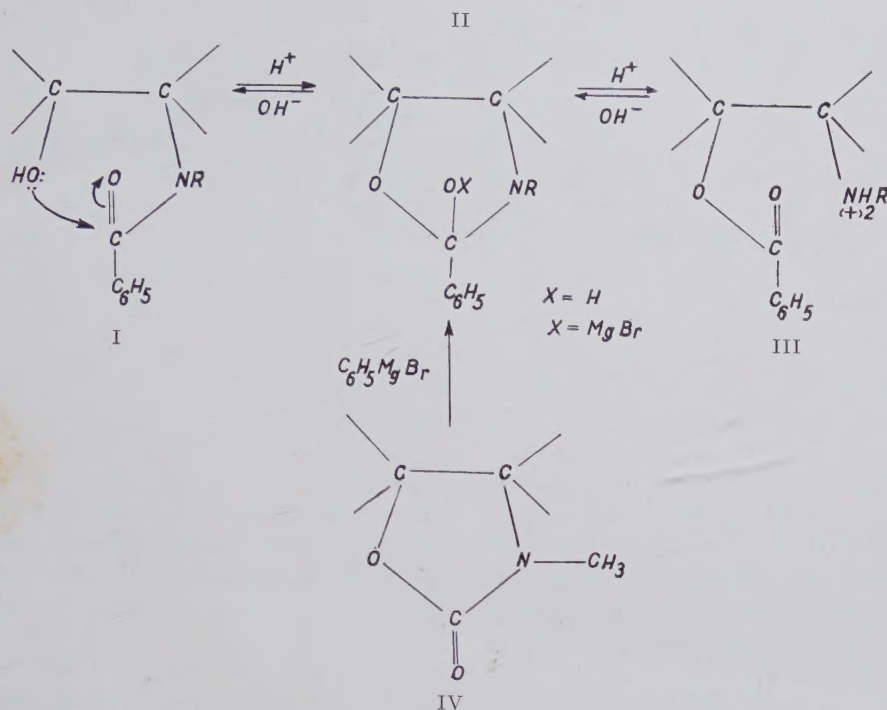


Abb. 2.

anlasste SIXMA und Mitarbeiter¹ – unter Voraussetzung der Wannenform des Piperidinringes im Tropan – für Tropin die *cis*- und für ψ -Tropin die *trans*-Form anzunehmen. Unter der gleichen Voraussetzung wurden bei der Anwendung der Konformationsanalyse auf die Reduktionsvorgänge von Tropinon zu Tropin (durch Druckhydrieren²) und zu ψ -Tropin (durch «chemische» Methoden³) die gleichen unrichtigen Konfigurationen angenommen⁴.

¹ F. L. J. SIXMA, S. M. SIEGMANN und H. C. BEYERMANN, Proc. Acad. Amsterdam [B] 54, 452 (1951).

² L. C. KEAGLE und W. H. HARTUNG, J. Amer. Chem. Soc. 68, 1608 (1946).

³ R. WILLSTÄTTER, Ber. dtsch. chem. Ges. 29, 393, 936, 939 (1896).

⁴ R. WILLSTÄTTER und F. IGLAUER, Ber. dtsch. chem. Ges. 33, 1170 (1900).

⁵ N. L. PADDOCK, Chem. and Ind. 1953, 63.

Um diese Unsicherheiten zu umgehen, haben wir die an 2-Aminoalkoholen bewährte Acylwanderungsmethode auch auf die hier vorliegenden 3-Aminoalkohole angewandt. Sie lieferte uns an Hand der N-Acyl-nor-tropine im September 1951 den sicheren Beweis¹ sowohl für die *syn*-Stellung der OH-Gruppe zum Ring-N im ψ -nor-Tropin und seiner sämtlichen N-methylierten und O-acylierten natürlichen Abkömmlinge, wie zum Beispiel Tropakokain und Tigloidin, als auch für die *anti*-ständige Sauerstofffunktion der (*nor*-)Tropinester Atropin, Hyoscyamin (Abb. 4), Convolamin,

¹ G. FODOR, Vortrag J.-Versamml. ungar. Ges. Physiol. Debrecen, 6. Sept. 1951; Acta Physiol. Acad. Sci. Hungar. 3, 27 (1953); Vortrag akad. Festwoche, 11. Dez. 1951, Budapest, Sitz.-Ber. Chem. Klasse Ungar. Akad. Wiss. 2, 43 (1952). – G. FODOR und K. NÁDOR, Nature 169, 462 (März 1952); J. Chem. Soc. 1953, 724.

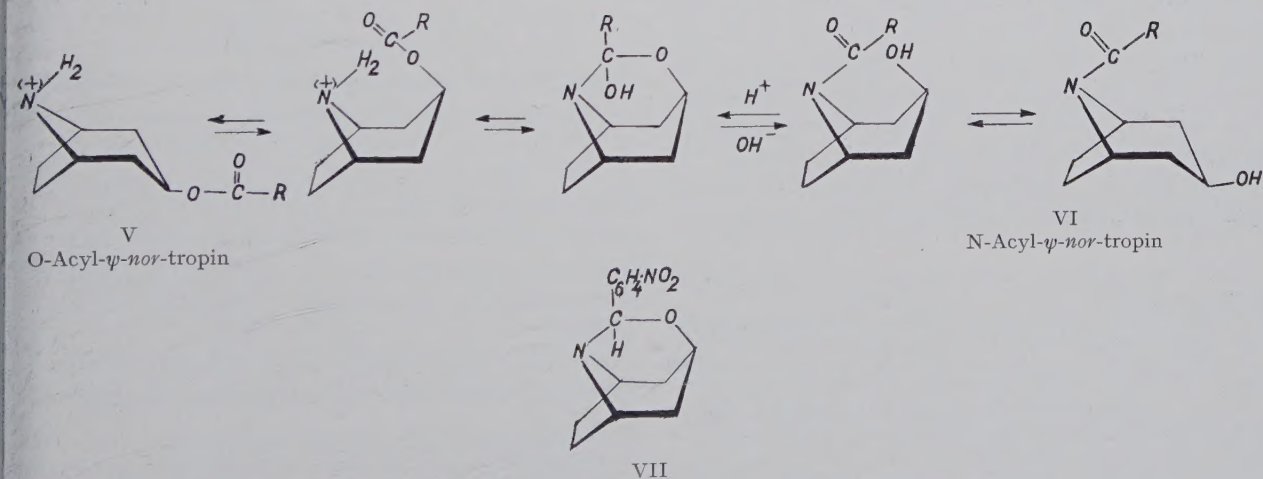


Abb. 3.

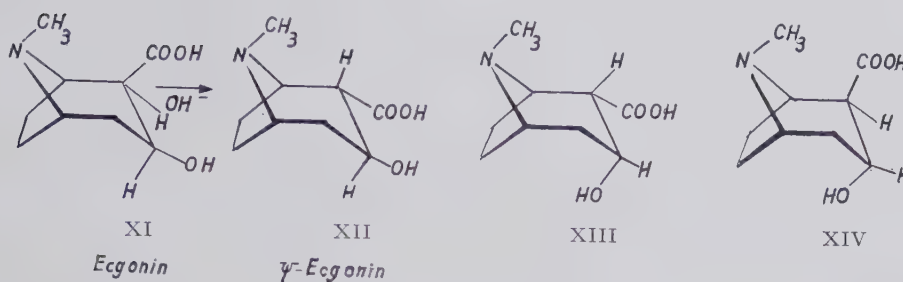


Abb. 5.

die gegenseitige Lage der OH- und COOH-Gruppen in Ecgonin und ψ -Ecgonin bestimmt werden; zweitens war die *syn*- oder *anti*-Stellung zur Brücke für die OH-Gruppe an C-3 u.a. mit Hilfe der beim Tropin erprobten Methoden zu beweisen; und drittens sollte zur Bestätigung die räumliche Lage der Carboxylgruppen zum Ringstickstoff untersucht werden.

Die β -Oxycarbonsäuren Ecgonin (XI) und ψ -Ecgonin (XII) führten wir durch den Curtiuschen Abbau in zwei stereoisomere 2-Benzamido-3-tropanole über, die darauf der $N \rightarrow O$ -Acylwanderungsreaktion unterworfen wurden. Beim Ecgoninderivat verlief diese positiv (XV $\rightarrow$ XVI), bei der epimeren Form aber blieb sie aus¹. Da der Curtiusche Abbau allgemein nicht von Waldenscher Umkehrung begleitet ist², so liess sich daraus für Ecgonin die *cis*-Lage, für ψ -Ecgonin die *trans*-Stellung der benachbarten funktionellen Gruppen OH und COOH erschliessen. Die Acylwanderungsmethode konnte damit zugleich auf die indirekte Konfigurationsermittlung von β -Oxycarbonsäuren ausgedehnt werden.

Zur Bestätigung wurden andere stereospezifische Reaktionen durchgeführt. Ecgoninol (XVII), das LiAlH_4 -Reduktionsprodukt von Kokain, lieferte mit Benzaldehyd ein zyklisches Benzyliden-acetal XVIII, während beim entsprechenden 1,3-Diol aus ψ -Ecgonin unter gleichen Umständen keine Ringbildung erfolgte¹. Den entscheidenden dritten Beweis lieferte der spontane Ringschluss des 2-Chlormethyl-3-tropanols (XIX, aus Kokain) zum Hydrochlorid eines Vierringäthers³ XX. Letzterer konnte – den Epoxyden ähnlich – sowohl durch H^+ - wie auch OH-Ionen gespalten werden⁴ (Abb. 6). Die Verknüpfung eines Sechsrings mit einem Vierring kann ausschliesslich bei *cis*-Stellung der beiden Substituenten erfolgen.

Für den Konfigurationsbeweis der dritten racemischen Form des Ecgonins sind ähnliche Untersuchungen bereits im Gange. Diese Verbindung ist, wie bereits WILLSTÄTTER beobachtete, äusserst leicht zu dehydrieren; man darf nach allgemeinem Prinzip daher annehmen¹, dass H an C-2 und OH an C-3 *trans*-ständig sind, woraus *cis*-Stellung von OH und COOH folgt. Seitdem gelang es, vom (XX) Vierringäther ausgehend die zwei bisher unbekannten Epimeren des Ecgoninols stereospezifisch darzustellen (1. Dezember 1954).

Die zweite Aufgabe bestand darin, die Lage der OH-Gruppen von Ecgonin und ψ -Ecgonin zum Ringstickstoff zu bestimmen. Bei dem aus ψ -Ecgonin (XII) erhältlichen N-Acetyl-*nor*- ψ -ecgonin-äthylester verlief die $N \rightarrow O$ -Acylwanderung leicht und reversibel. An der *syn*-(β)-Stellung dieser Gruppe im ψ -Ecgonin war danach nicht zu zweifeln; damit war die volle Konfiguration des ψ -Ecgonins schon Ende 1951 sichergestellt¹. Den aus Kokain (IX) erhaltenen N-Acetyl-*nor*-ecgonin-äthylester konnte man dagegen durch Einwirkung dioxanischen Chlorwasserstoffs nicht in ein Aminoestersalz überführen. Dieses negative Ergebnis führte uns zuerst zur Annahme, dass die OH-Gruppe im Ecgonin¹ (und auch im Kokain) *anti*-(α)-ständig ist. 1952/53 wurde diese Feststellung überprüft², indem die COOH-Gruppen in beiden Epimeren in CH_3 umgewandelt und die OH-Gruppen zu Oxogruppen dehydriert wurden. Wir erhielten nun zwei verschiedene Ketone (XXI, XXII), die aber in alkalischem Medium das gleiche Oxim lieferten³ (Abb. 6). Bei der Spaltung desselben entstand jedoch allein das Keton XXII aus dem ψ -Ecgoninderivat, folglich erlitt das Keton XXI aus Ecgonin beim Oximieren eine Inversion am zur Oxogruppe α -ständigen C-Atom. Demnach unterscheiden sich sowohl die 2-Methyl-3-tropanole wie auch ihre «Vorgänger», Kokain und ψ -Kokain, bloss am Asymmetriezentrum C-2 und nicht, wie WILLSTÄTTER

¹ G. FODOR, Vortrag akad. Festwoche, 11. Dez. 1951, Budapest, Sitz.-Ber. Chem. Klasse Ungar. Akad. Wiss. 2, 43 (1952); Nature 170, 278 (September 1952). – G. FODOR und Ö. KOVÁCS, J. Chem. Soc. 1953, 724.

² E. R. ALEXANDER, Principles of Ionic Organic Reactions (Chapman & Hall, London 1950), S. 118. Einzig im Fall des Abbaues der *trans*-Hexahydro-1,3-phtalsäure konnten A. SKITA und R. RÖSSLER eine Inversion beobachten: Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 461 (1939).

³ Die I.R.-spektroskopische Untersuchung dieser Substanz lieferte dank Herrn Dr. P. ZOLLER (Universität Basel) den Beweis für diese Struktur.

⁴ Vortrag von G. FODOR an der Winterversammlung der Schweiz. chem. Ges. in Zürich, 28. Febr. 1954, Chimia 8, 179 (1954). – G. FODOR, Ö. KOVÁCS und I. WEISZ, Nature 174, 131 (1954); Helv. chim. Acta 37, 892 (1954).

¹ G. FODOR, Vortrag akad. Festwoche, 11. Dez. 1951, Budapest, Sitz.-Ber. Chem. Klasse Ungar. Akad. Wissensch. 2, 43 (1952); Nature 170, 278 (1952). – G. FODOR und Ö. KOVÁCS, J. Chem. Soc. 1953, 724.

² Eine briefliche Diskussion dieser Frage erfolgte mit Prof. W. HÜCKEL (Tübingen) und Dr. G. STORK (Harvard).

³ Vortrag von G. FODOR an der Winterversammlung der Schweiz. chem. Ges. in Zürich, 28. Febr. 1954, Chimia 8, 179 (1954). – G. FODOR, Ö. KOVÁCS und I. WEISZ, Nature 174, 131 (1954); Helv. chim. Acta 37, 892 (April 1954).

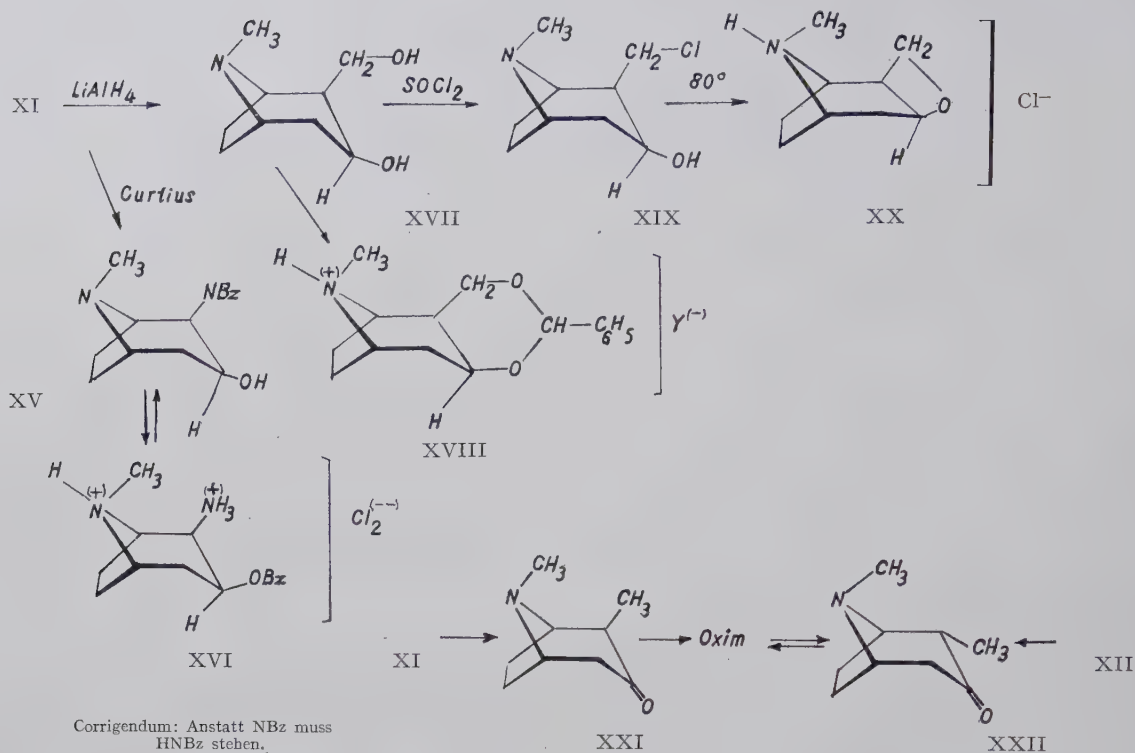


Abb. 6.

vermutete¹ und wir selbst auch früher annahmen, in der Lage der am C-3 haftenden OH-Gruppe.

Andererseits konnten wir die epimeren 2-Methyl-3-tropanole durch die v. Braunsche Reaktion zu den 2-Methyl-nor-tropanolen abbauen; beide lieferten mittels p-Nitrobenzaldehyd – nach der von HARDEGGER am nor- ψ -Tropin erprobten Methode² – μ -Aryl-1,3-oxazinderivate (XXIII, XXIV) zwischen NH und 3-ständiger OH-Gruppe, was die *syn*-(β)-Stellung von OH sowohl im Kokain (IX) als auch im ψ -Kokain beweist.

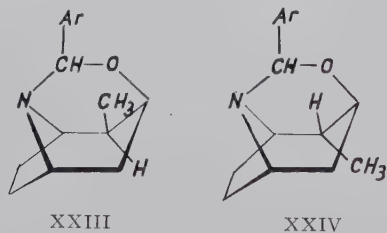


Abb. 7.

Unabhängig von diesen Versuchen untersuchte FINDLAY³ durch Anwendung der Acylwanderungsmethode die Konfiguration der OH-Gruppe an C-3 im O-Benzoyl-nor-ecgonin. In diesem Modell verlief die O $\rightarrow$ N-Acylwanderung zwar nicht augenblicklich, aber doch in ausreichendem Masse. Es gelang uns auch,

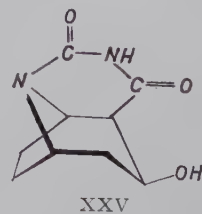


Abb. 8.

Die Kombination dieser Resultate liefert die vollständigen Konfigurationsformeln von Kokain als 2- β -Carbomethoxy-3- β -benzoxy-tropan und von ψ -Ko-

¹ R. WILLSTÄTTER und A. BODE, Ber. dtsch. chem. Ges. 33, 416 (1900); Liebigs Ann. Chem. 326, 46 (1902). – R. WILLSTÄTTER und M. BOMMER, Liebigs Ann. Chem. 422, 18 (1921).

² E. HARDEGGER und H. OTT, Helv. chim. Acta 36, 1186 (1953).

³ S. P. FINDLAY, J. Amer. Chem. Soc. 75, 6424, vorläufige Mittg. (Nov. 1953); 76, 2855 (Juni 1954).

¹ Vortrag von G. FODOR an der Winterversammlung der Schweiz. Chem. Ges. in Zürich, 28. Febr. 1954, Chimia 8, 179 (1954). – G. FODOR, Ö. KOVÁCS und I. WEISZ, Nature 174, 131 (1954); Helv. chim. Acta 37, 892 (April 1954).

² S. P. FINDLAY, loc. cit.

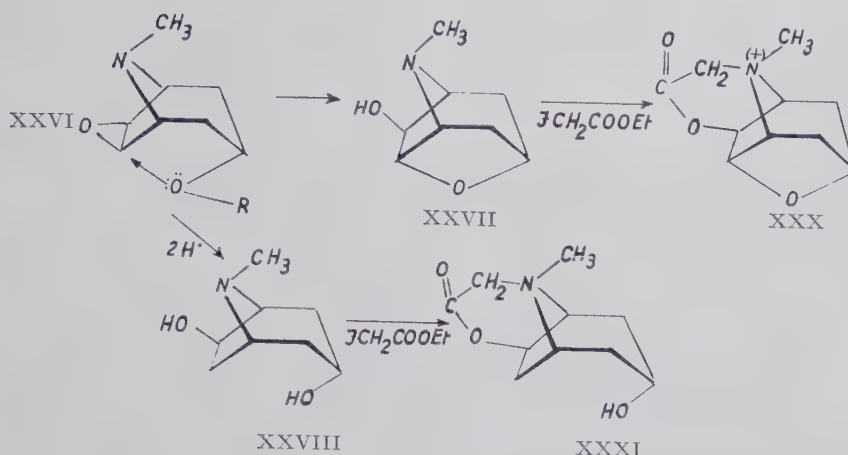


Abb. 9.

Die Konfiguration der am Pyrrolidinring Sauerstoff-funktionen enthaltenden Tropanalkaloide

In diesem Falle gestaltet sich die Beweisführung teils auf theoretisch-deduktivem, teils auf experimentellem Weg. Ende 1951 gelang es, die schon längst bekannte Umwandlung des Scopolamins bzw. Scopins zu Scopolin (Oscin) zu deuten und daraus Schlüsse auf die Konfiguration des Scopolamins zu ziehen¹. Dieser Ringschluss zum Tetrahydrofuranderivat XXVII kann nur im Falle eines nukleophilen Angriffes der 3-anti(α)-ständigen HO-Gruppe gegen den «Pfeiler» der 6,7-ständigen Epoxydbrücke erfolgen, wobei in Oscin eine neue, 6(7)-syn(β)-ständige HO-Gruppe zustande kommt. Demnach kommt Scopolamin die Struktur des 3 α -Tropoyloxy-6,7 β -epoxytropans (XXVI) zu. Diese Anwendung bekannter stereochemischer Gesetze zur Deduktion der Raumformel des Scopolamins wurde 1953 unabhängig auch von MEINWALD² und COOKSON³ publiziert.

Die experimentelle Bestätigung gelang 1952 mit der Hydrogenolyse des Epoxydringes des Scopolamins zum racemischen 3 α ,6 β -Dioxy-tropan (XXVIII)⁴; die linksdrehende Form desselben erwies sich mit der Alkamin-komponente des natürlichen Valeroidins⁵ als identisch. Interessanterweise gelang es zu gleicher Zeit STOLL und JUCKER, dieselbe Verbindung aus Äpfelsäure-dialdehyd vollsynthetisch⁶ aufzubauen. Die räumliche Nachbarschaft von 6-OH und N war von MITCHELL und TRAUTNER⁵ bewiesen worden; sie erhielten bei der Oxydation von Valeroidin (XXVIII-3-valeroat) ein cyclisches Urethan, das bei der Hydrolyse *nor*-Valeroidin

¹ G. FODOR, Vortrag akad. Festwoche, 11. Dez. 1951, Budapest, Sitz.-Ber. Chem. Klasse Ungar. Akad. Wissensch. 2, 43 (1952); Nature 170, 278 (September 1952). – G. FODOR und Ö. KOVÁCS, J. Chem. Soc. 1953, 724.

² J. MEINWALD, J. Chem. Soc. 1953, 712.

³ R. C. COOKSON, Chem. and Ind. 1953, 337.

⁴ G. FODOR, Ö. KOVÁCS und L. MÉSZÁROS, Research 5, 534 (November 1952).

⁵ W. MITCHELL und E. M. TRAUTNER, J. Chem. Soc. 1947, 1330.

⁶ A. STOLL, B. BECKER und E. JUCKER, Helv. chim. Acta 35, 1263 (1952); 36, 1566 (1953).

kain als 2 α -Carbomethoxy-3 β -benzoxy-tropan; dennoch unternahmen wir zur Bestätigung auch den dritten Teil der Beweisführung, die Verknüpfung des Ring-N-Atoms mit der 2-ständigen Carbomethoxygruppe von Kokain. Kokain (IX) konnte über N-Cyanor-kokain und N-Carbamyl-*nor*-kokain in ein ringförmiges Ureid XXV verwandelt werden. Die Kondensation wurde mit Natriummethylat bewerkstelligt, und zwar unterhalb -15° , um eine α -Inversion zu vermeiden (Abb. 8). Damit sind die obigen Formeln bestätigt¹.

Es fragt sich, warum Tropin am C-3 und Ecgonin am C-2 durch Alkalien epimerisiert wird. Die Rolle der Alkalialkoholate in der Inversion von sekundären Alkoholen beruht nach unserem heutigen Wissen² auf einem Oxydoreduktionsvorgang über das Keton, wobei zum Beispiel Natriumamylat die Rolle des Aluminiumisopropylates der Verley-Meerwein-Ponndorf-Reaktion übernimmt. Bei der Inversion von Carbonsäure-estern ist hingegen ein Enolisierungsmechanismus, der das H-Atom des α -C-Atoms einbezieht, anzunehmen. Während nun WILLSTÄTTER Ecgonin mit starkem Alkali 12–20 h kochte, um es in *ψ*-Ecgonin umzuwandeln, gelang es unlängst FINDLAY³, Kokain mittels $\frac{1}{10}$ Mol Natriummethylat rasch in *ψ*-Ecgoninmethylester umzuwandeln. Eine so milde Einwirkung von Alkali wäre zur Epimerisierung eines sekundären Alkohols unzulänglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Acylwanderungsmethode sowohl für die Bestimmung der beiden funktionellen Gruppen OH und COOH wie auch für die Feststellung der Lage der OH-Gruppen zum N eine wichtige Rolle spielte. Sie konnte, wie gezeigt, auf die Konfigurationsbestimmung von β -Oxycarbonsäuren ausgedehnt werden.

¹ Inzwischen bewiesen E. HARDEGGER und H. OTT die absolute Konfiguration des Kokains, Helv. chim. Acta 38, 312 (1955).

² W. E. DOERING und T. C. ASCHNER, J. Amer. Chem. Soc. 75, 393 (1953).

³ S. P. FINDLAY, J. Amer. Chem. Soc. 75, 4624, vorläufige Mittg. (Nov. 1953); endgültige 76, 2855 (Juni 1954).

lieferte. Damit war auch die *syn*-Stellung der 6-ständigen Sauerstofffunktion in Scopolamin (XXVI), Oscin (XXVII) usw. erwiesen.

Methode der quartären Laktonsalzbildung

Ein endgültiger Beweis sowohl für die Konfiguration von Valeroidin als auch für Teloidin wurde unlängst durch eine neue Bestimmungsmethode¹ für die Raumstruktur von Aminoalkoholen mit tertiär gebundenem Stickstoff ermöglicht.

Die Einwirkung von Jodessigester auf Oscin (XXVII), dl-3 α ,6 β -Dioxy-tropan (XXVIII) und 3 α ,6 β ,7 β -Trioxy-tropan (Teloidin, XXIX) lieferte in allen drei Fällen Laktone¹ der quartären N-Carboxymethyl-tropanium-Salze (XXX, XXXI). Feuchtes Silberoxyd spaltet den Laktonring zum Betain auf, das durch Halogenwasserstoffsäuren umgekehrt wieder laktonisiert wird. Diese Ringschlussreaktion fordert eindeutig die *syn*-(β)-Stellung der OH-Gruppen zum Ringstickstoff.

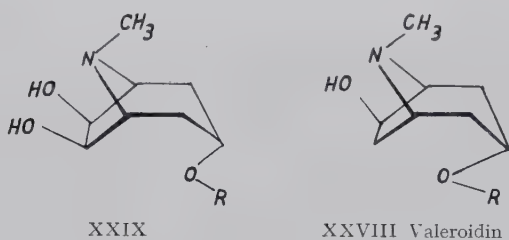


Abb. 10.

Demnach liegt nunmehr die Konfiguration sämtlicher wichtiger Tropanalkaloide eindeutig fest.

Die selektive Quaternisierung am Ringstickstoff

Wendet man die üblichen Vorstellungen vom Bau des dreiwertigen Stickstoffs (pyramidale Orientierung

der Valenzen, Oszillation des N zwischen zwei Extrem-lagen) auf tertiäre Tropanderivate an, so wäre bei der Einwirkung von Jodessigester die gleichzeitige Bildung von zwei am N diastereomeren Formen zu erwarten. Überraschenderweise wurde jedoch sowohl beim Tropin (3 α -Tropanol) wie auch beim ψ -Tropin (3 β -Tropanol), die Bildung nur einer einzigen Modifikation beobachtet. Kehrt man nun die Reihenfolge der Quaternisierung um, indem man zum Beispiel nicht ψ -Tropin mit Jodessigester behandelt, sondern in *nor*- ψ -Tropin zuerst Carbäthoxymethyl einführt und dann mit Methyljodid quaternisiert, so erhält man die am N diastereoisomere Verbindung¹ (Abb. 11). Dasselbe gilt auch für die Quaternisierung von *nor*-Tropin bzw. Tropin. Die Verschiedenheit dieser quaternären Isomeren konnte sowohl mikrophotographisch-kristallographisch² als auch durch Debye-Scherrer-Diagramme bewiesen werden.

Diese Versuchsergebnisse sind am besten verständlich, wenn man annimmt, dass der dritte Substituent am pyramidalen N in einer relativ stabilen Lage fixiert ist, was zugleich eine bestimmte Orientierung des ungebundenen Elektronenpaares bedeutet (π -Orbital).

Da nun bei der Einwirkung des Alkylierungsmittels Jodessigester auf Oscin, 3,6-Dioxy- und 3,6,7-Trioxytropan sich allein das Laktone des quartären Salzes (XXX XXXI), nicht aber das N-epimere N-Carbäthoxymethyl-derivat isolieren liess, ist anzunehmen, dass das ungebundene Elektronenpaar des Ringstickstoffes bevorzugt auf der Seite der 6-OH-Gruppe zu finden ist. Der dritte Substituent in tertiären Tropinen muss sich demnach mit grösserer Häufigkeit dem Piperidinring zuneigen und damit eine axiale, das heisst energetisch eigentlich nicht begünstigte Lage³ einnehmen. Indessen

¹ G. FODOR, Vortrag Kongr. Organ. Chem. Ungar. chem. Ges., 19. Sept. 1952 in Szeged; Magy. Kém. Foly. 59, 242 (1953).

² G. FODOR, J. TÓTH und Mitarbeiter, Vortrag Kongr. organ. Chemie Ungar. chem. Ges. 26. Sept. 1953 in Debrecen; Vegyipari Kut. Int. Közl. 4, 293 (1953).

³ 1,3-diaxial substituierte Cyclohexane enthalten dennoch die Gruppe C₂ eher in axialer als in äquatorialer Lage (D. H. R. BARTON, Chem. Ind. 1953, 664).

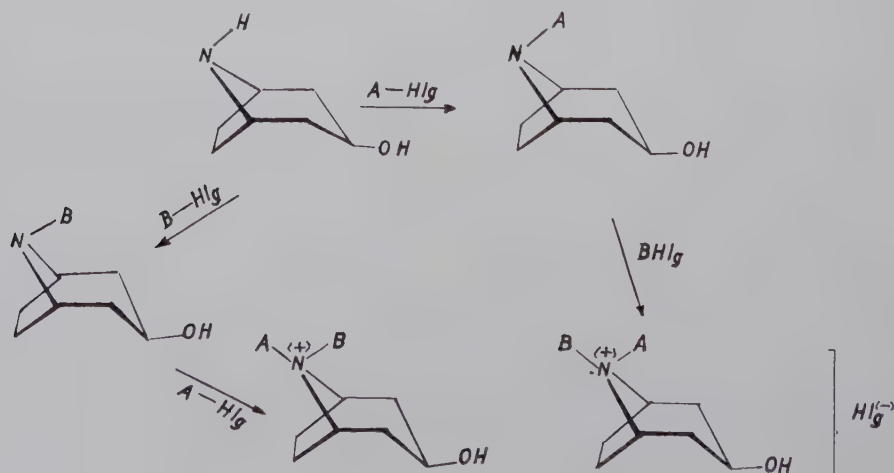


Abb. 11

¹ G. FODOR, J. TÓTH und Mitarbeiter, Vortrag Kongr. organ. Chemie Ungar. chem. Ges. 26. Sept. 1953 in Debrecen; Vegyipari Kut. Int. Közl. 4, 293 (1953). – G. FODOR, Vortrag an der Winterversammlung Schweiz. chem. Ges., 28. Febr. 1954 in Zürich, Chimia 8, 179 (1954); Helv. chim. Acta 37, 907 (1954).

müssen auch die im deformierten Fünfring herrschenden abstossenden Kräfte (Pitzer-Spannung¹) zwischen den H-Atomen und der N-CH₃-Gruppe in Betracht gezogen werden², und diese Wirkung scheint demnach zu überwiegen.

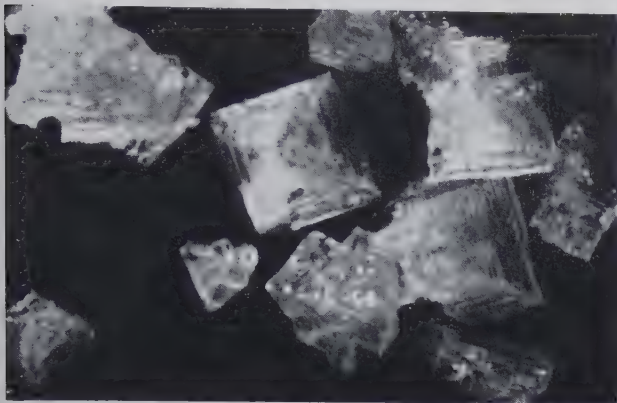


Abb. 12 a. Tropin-äthojodid. 20fach vergrössert unter gekreuztem Nicol.

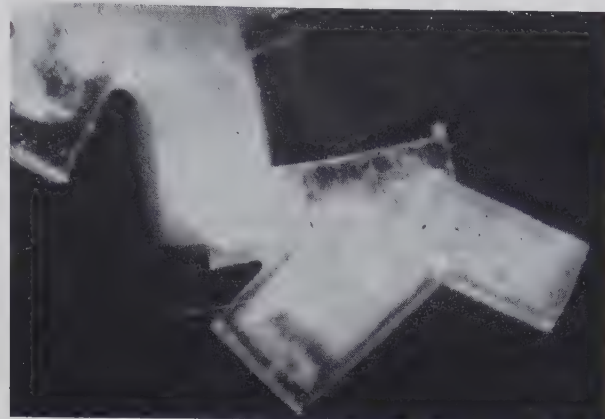


Abb. 12 b. N-Äthyl-nor-tropin-methojodid. 60fach vergrössert, unter gekreuztem Nicol.

Diese Versuchsergebnisse widersprechen teilweise den Beobachtungen von FINDLAY³, wonach die Quarternisierung von N-Äthyl- und N-Propyl-nor-tropin mit n-Propyl- bzw. Äthyljodid-Isomere liefert, die N-Äthylisierung von Tropin und N-Methylierung von N-Äthyl-nor-tropin hingegen zum gleichen Endprodukt führt. Als wir diese Versuche jedoch in Alkohol-Benzol bei niedriger Temperatur (25° statt in siedendem Äthanol) wiederholten, erhielten wir auch hier je nach der Reihenfolge der eintretenden Substituenten epimere Verbindungen. Die Verschiedenheit erhellt aus Abbildung 12: Tropin-äthojodid ist optisch *isotrop* und kristallisiert im regulären System, N-Äthyl-nor-tropin-methojodid stellt hingegen optisch *anisotrope* Kristalle dar und kristallisiert in einem der keine Hauptachse enthaltenden Systeme.

Da nun an der Identität der von FINDLAY erhaltenen zwei Produkte nicht zu zweifeln ist, lässt sich der Unterschied auf folgende Weise deuten. Das *Umschwingen* des dritten Substituenten am tertiären Stickstoff ist von nicht allzu hohem Energiebedarf; diese Energie kann am Siedepunkt des Äthylalkohols vom System aus der Umgebung aufgenommen werden. Wenn hier also ein dynamisches Gleichgewicht vorliegt, so ist die Bildung des Endproduktes – wie FINDLAY meint⁴ – thermodynamisch bedingt, das heisst, die grössere Stabilität des einen der zwei Endprodukte entscheidet über die Reaktionsrichtung.

Wird hingegen die Reaktion bei tieferer Temperatur durchgeführt, so wirkt allein die optimale Lage des

dritten Substituenten, die zugleich eine definitive Orientierung des freien π -Orbitals zur Folge hat, bestimmend auf die Struktur des Endproduktes.

Diese Selektivität sollte sowohl auf thermodynamischem als auch auf kinetischem Wege noch näher untersucht werden. Die Erscheinung ist jedenfalls nicht uninteressant und trägt zu unseren Kenntnissen bezüglich der Stereochemie des «dreiwertigen» Stickstoffs bei. Wir glauben, dass sie sich kaum auf kondensierte Pyrrolidinringe beschränkt; die Ausdehnung der Untersuchungen auf Nikotin, Oxyprolin usw. ist deshalb im Gange.

Raumstruktur und physiologische Wirkung der Tropanalkaloide

Es ist nicht die Aufgabe des Stereochemikers, die neuen Erkenntnisse über die Feinstruktur dieser Heilmittel zur Deutung ihrer physiologischen Wirkung auszuwerten¹. Jedenfalls scheint die veresterte 3β -(syn)-ständige OH-Gruppe eine wesentliche Bedingung für die anästhetische Wirksamkeit von Tropanolen (wie zum Beispiel Tropakokain, Kokain, Psikain) zu sein. Andererseits ist es auffallend, dass die mydratische Wirkung dieser Körperklasse jeweils mit der zum N *anti*-(α)-ständigen veresterten OH-Gruppe an C-3 verbunden ist und dass sie von der am C-6(7) verätherten OH-Gruppe(n) wie beim Scopolamin oder bei den neuesten, von STOLL, JUCKER und Mitarbeitern dargestellten 6β -Alkoxy- 3α -tropanolen günstig² beeinflusst wird. Freie OH-Gruppe(n) in 6(7)-Stellung löschen dagegen diese Wirkung völlig aus.

¹ CH. W. BECKETT, K. S. PITZER und R. SPITZER, J. Amer. Chem. Soc. 69, 2488 (1947).

² Prof. V. PRELOG sei für die fruchtbare Diskussion dieser Frage (26. Februar 1954) auch an dieser Stelle gedankt.

³ S. P. FINDLAY, J. Amer. Chem. Soc. 75, 3204 (1953).

⁴ S. P. FINDLAY, J. Amer. Chem. Soc. 75, 3204 (1953).

¹ Eine wertvolle Besprechung neuester Ergebnisse gaben A. STOLL und E. JUCKER im unlängst erschienen P.-Ehrlich-Festheft der Angewandten Chemie [66, 376 (1954)] bekannt.

² A. STOLL, E. JUCKER und A. LINDENMANN, Helv. chim. Acta 37, 495, 649 (1954). – E. ROTHLIN, M. TAESCHLER, H. KONZETT und A. CERLETTI, Exper. 10, 143 (1954).

Der Einfluss der räumlichen Lage der 3-OH-Gruppe¹ wie auch – auf Grund der beschriebenen Ergebnisse zur Darstellung N-epimerer quartärer Tropinumsalze – der Lage der Substituenten am Ring-N auf den curarinartigen Effekt dieser Stoffe soll von ISSEKUTZ, NÁDOR und GYERMEK ausgewertet werden.

Biogenese und Stereochemie der Tropanalkaloide

Die Synthese von Tropan-3-ketonen (XXXIII) wird heute am besten durch Kondensieren eines 1,4-Dialdehyds (Succindialdehyd, Äpfelsäuredialdehyd, Mesoweinsäuredialdehyd usw.) mit einem primären Alkyl-(Aralkyl)-amin und Azeton (oder besser Azeton-dikarbonsäure bzw. ihre Halbestere) nach ROBINSONS Prinzip durchgeführt² (Abb. 13). Dieser Reaktionsweg erscheint nach Arbeiten von SCHÖPF und Mitarbeiter³ durchaus als «zellmöglich», da er auch unter den in der Pflanzenzelle üblichen pH-Werten und Konzentrationen glatt zu 3-Tropanonen wie Tröpinon, Teloidinon⁴ usw. führt.

Nach den an der lebenden *Datura-stramonium*-Pflanze ausgeführten Fütterungsversuchen scheint Arginin bzw. Ornithin die Ursubstanz für Hyoscyamin (1 Tropoyl-3 α -tropanol) zu sein⁵. Ornithin kann mit Hilfe einer Oxydase dieser Pflanze in α -Oxo- δ -amino-valeriansäure überführt werden⁶, deren Stickstoff vermutlich denjenigen des Tropanskelettes zu liefern vermag. 1,4-Diaminobutan als Decarboxylierungsprodukt von Ornithin⁷ ist kein Zwischenprodukt, da aus C¹⁴-markiertem Putrescin kein radioaktives Hyoscyamin gebildet wird⁸. Es fehlen noch Fütterungsversuche mit markierter α -Oxo- δ -amino-valeriansäure wie auch mit Succindialdehyd und Methylamin, um den Bildungsmechanismus von Tropanalkaloiden endgültig aufklären zu können.

Im Pflanzenreich kommen sowohl *nor*-Tropeine (das heisst *nor*-Tropin-3-Ester) wie auch Tropeine und Pseudotropeine vor. Die beiden letzten mögen durch nachträgliche Methylierung aus den *nor*-Derivaten entstanden sein. Jedenfalls ist es bemerkenswert, dass kein einziger *nor-ψ*-Tropin-Ester aufgefunden worden ist. Es ist nicht auszuschliessen, dass sich solche im neutralen Medium in N-Acylderivate umlagern⁹ und dadurch der üblichen Isolierungsmethode¹⁰ (Extraktion mittels verdünnter Säuren) entgehen.

Die Tatsache, dass sämtliche asymmetrisch gebauten Tropanalkaloide in der Natur jeweils in optisch aktiver Form und nie als Racemate entdeckt worden sind, veranlasste SCHÖPF¹, sich ihren Bildungsvorgang in zwei Stufen vorzustellen. Zuerst sollen in spontanem Zusammentreffen reaktionsfähiger Moleküle 3-Oxo-tropane (XXXIII) entstehen, die dann unter Mitwirkung von Enzymen einer asymmetrischen Reduktion zu den entsprechenden Tropanolen unterliegen. Diese Vermutung ist jedoch für die Biosynthese des optisch aktiven 3,6-Dioxytropans nur dann aufrechtzuerhalten, wenn man als Baustein der Robinsonschen Kondensation optisch aktiven Äpfelsäuredialdehyd vermutet. Es ist auch zu bedenken, dass in sämtlichen natürlichen, an C-6(7) Sauerstofffunktion enthaltenden Tropanen diese Gruppe *syn*-(β)-ständig ist², während die Laboratoriumssynthese gerade im Falle des 6-Oxy-3-tropinons aus ($\pm$)-Äpfelsäuredialdehyd zu einem Gemisch beider Racemate³ (6 α und 6 β) führte. Der Verlauf der Biogenese ist demnach in diesem Fall von dem der Laborsynthese stereochemisch verschieden.

Andererseits müsste zur Bildung des natürlichen (-)-Ecgonins und (+)- ψ -Ecgonins nach dem «zweistufigen» Mechanismus⁴ angenommen werden, dass spontan ($\pm$)-Ecgoninonester (XXXIII, Z = COOCH₃) entsteht und darauf ein Antipode enzymatisch zu den diastereoisomeren Alkoholen reduziert wird. Es fragt sich, weshalb der unverbrauchte (-)-Ecgoninonester oder irgendein Umwandlungsprodukt desselben sich bisher nicht isolieren liess. Man muss bis zur genauen Überprüfung dieser Teilprozesse wohl eher vermuten, dass das spontane Zusammentreffen reaktionsfähiger Bausteine in Gegenwart von Enzymen, von diesen gesteuert, stereochemisch spezifisch vor sich geht und die durch das asymmetrische System begünstigten Endprodukte liefert.

Eine weitere stereochemische Frage betrifft das schon erwähnte Überwiegen der *syn*-Lage von O-Funktionen am C-6(7) in den natürlichen Tropanen. ALDER⁵ vermutete im 3,6,7-Trioxy-tropan die Anwesenheit einer H-Brücke zwischen C-6-OH-Gruppe und dem Ringstickstoff; diese dürfte schon in dem aus 1,4-Dialdehyd und Methylamin entstandenen Oxy-pyrrolidinderivat (Abb. 13) (zwischen N und X oder Y) ausgebildet sein, wodurch die *syn*-Lage dieser Gruppe im 6,7-Dioxy-tropinon prädestiniert wäre. Nach KARRER⁶ ist hingegen die häufigere *syn*-Lage bedingt durch die geringere sterische Hinderung als bei *anti*-Stellung;

¹ Vortrag von B. ISSEKUTZ sen. am Kongr. Ungar. Ges. Physiol., Juni 1950, in Szeged, vgl. auch K. NÁDOR und L. GYERMEK, Acta chim. Hungar. 2, 369 (1952); 3, 323 (1953).

² R. ROBINSON, J. Chem. Soc. 111, 876 (1917).

³ CL. SCHÖPF und G. LEHMANN, Liebigs Ann. Chem. 518, 1 (1935).

⁴ CL. SCHÖPF und H. ARNOLD, Liebigs Ann. Chem. 558, 109 (1947).

⁵ W. O. JAMES, Nature 158, 654 (1946).

⁶ W. O. JAMES und H. BEEVERS, Biochem. J. 43, 11 (1948).

⁷ B. T. CROMWELL, Biochem. J. 37, 717, 722 (1943).

⁸ LÉO MARION und Mitarbeiter, Canad. J. Chem. 29, 964 (1951).

⁹ G. FODOR und K. NÁDOR, J. Chem. Soc. 1953, 721.

¹⁰ Bezüglich Einzelheiten siehe die ausführliche Monographie von R. H. F. MANSKE und H. L. HOLMES, The Alkaloids, I. Band (Academic Press, New York 1950), S. 271.

¹ CL. SCHÖPF und G. LEHMANN, Angew. Chem. 50, 783 und 803, Fussnote (1937).

² G. FODOR, Vortrag an der Winterversamml. Schweiz. chem. Ges., 28. Febr. 1954 in Zürich; Chimia 8, 179 (1954).

³ A. STOLL, B. BECKER und E. JUCKER, Helv. chim. Acta 35, 1263 (1952); 36, 1566 (1953).

⁴ CL. SCHÖPF und G. LEHMANN, Angew. Chem. 50, 783 und 803, Fussnote (1937).

⁵ K. ALDER und H. A. DORTMANN, Chem. Ber. 86, 1544 (1953).

⁶ J. KEHRLE und P. KARRER, Helv. chim. Acta 37, 484 (1954).

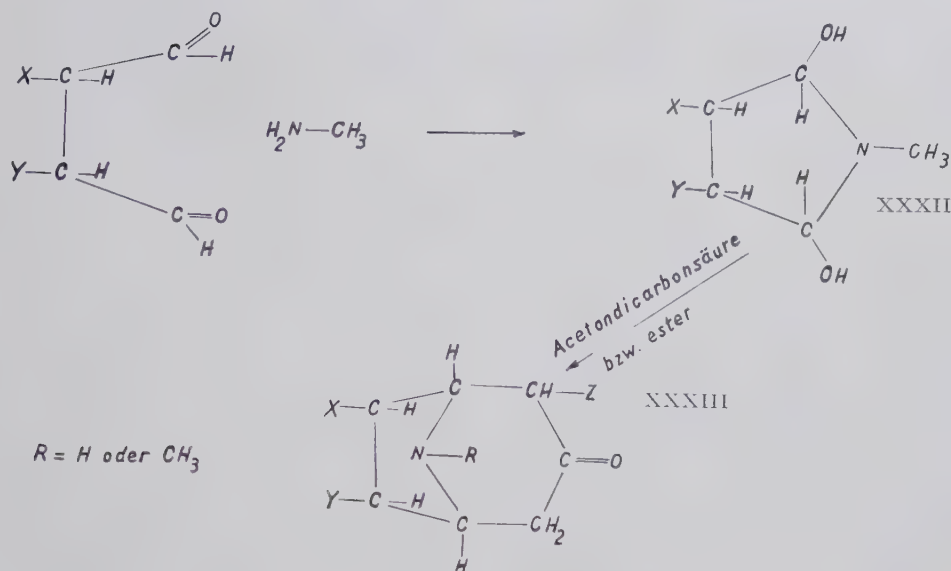


Abb. 13. Tropinon $X = Y = Z = H$; Teloidinon $X = Y = OH$; $Z = H$; 6-Oxytropinon $X = OH$; $Y = Z = H$;
Scopinon $X + Y = O$; $Z = H$; Ecgoninonester $X = Y = H$; $Z = COOCH_3$.

dies trifft allerdings bloss unter Annahme der Sesselform des Piperidinringes im Tropan zu. Leider fehlt es heute noch an Beweisen für die Konfiguration der Alkoxygruppen in 6-Alkoxy-tropinen¹. Ist diese nämlich *syn*, so kann für ihre Ausbildung die H-Brücke, die hier nicht existiert, keineswegs entscheidend sein. Die Bildung von 6 α -Oxy-tropanon² bei der Synthese spricht ebenfalls gegen die primäre Rolle der H-Brücke.

Es sei noch bemerkt, dass es angesichts der unlängst vergeblich versuchten Kondensation³ des Epoxy-succindialdehyds zum Scopolamin-ke-ton Scopinon zweifelhaft erscheint, ob *sämtliche* Tropane aus 1,4-Dialdehyden nach dem gleichen Schema entstehen. Eine zweite Möglichkeit, der gemeinsame Ursprung dieser Verbindungen in der Natur aus einem 6,7-ungesättigten Tropanderivat, muss demnach genauer überprüft werden. Es liegt auf der Hand, dass sich ein Stoff dieser Art durch einfache enzymatische Umwandlungen, wie Hydrieren, Oxydieren, Wasser- oder OH-Radikal-Anlagerung, zu den verbreiteten Tropanen Tropinon, Scopinon, Valeroidin-alkamin oder Teloidinon überführen liesse⁴. Leider ist zurzeit die Reindarstellung zureichender Mengen 6-Tropan-3-ons noch nicht ermöglicht worden.

Die Fragen der Biogenese der Tropanalkaloide sind demnach noch keinesfalls erschöpfend beantwortet; die Anwendung der Isotopentechnik öffnet aber hiefür den Weg.

Schlussbemerkungen

Die Aufklärung der Raumstruktur der Tropanalkaloide schliesst die Erforschung ihrer chemischen Konstitution ab. Die dabei verwendeten älteren und aufgefundenen neuen Arbeitsmethoden mögen auch zur Konfigurationsbestimmung weiterer Naturstoffklassen beitragen.

Die Methode zur Herstellung N-diastereomerer Ammoniumsalze grosser konfigurativer Stabilität bietet die Möglichkeit zur indirekten Bestimmung der räumlichen Lage des dritten Substituenten in esozyklischen tertiären Aminen.

Summary

The steric structure of the most important tropane alkaloids has been established in the course of the last three years.

The application of the method of transitory bridge formation, occurring during the intramolecular shift of acyl groups between neighbouring NH and OH groups has played a dominant rôle in these investigations.

In this way *ψ*-tropine has been proved to be of *syn* (β), tropine and consequently also its N- and O-substituted derivatives (e.g. atropine) of *anti* (α) configuration. The same method provided evidence for the *syn*-position of the C₃-OH groups in both ecgonine and pseudoecgonine further supported by cyclisation of both epimeric 2-methyl-*nor*-tropanols prepared from them into diastereomeric 1,3-oxazidines.

As a second step, the method has been extended to β -hydroxy-carboxylic acids by converting the C₂-COOH groups of both ecgonine and *pseudo*-ecgonine into benzamido groups, and subsequently by comparing these epimeric 2-amino-alcohols using the acyl migration method. Thus the *cis* relationship of the functional groups in cocain and the *trans* one in psicain has been elucidated. This statement could be corroborated by other stereospecific processes, e.g. intramolecular cyclisation of the 2-chloromethyl-3-tropanol from cocain

¹ A. STOLL, E. JUCKER und A. LINDENMANN, *Helv. chim. Acta* **37**, 495, 649 (1954).

² A. STOLL, B. BECKER und E. JUCKER, *Helv. chim. Acta* **35**, 1263 (1952); **36**, 1566 (1953).

³ CL. SCHÖPF und A. SCHMETTERLING, *Angew. Chem.* **64**, 591 (1952).

⁴ N. A. PREOBRASHENSKI und E. I. GENKIN, *Chem. organ. Arzneimittel* (Goschimizdat, Moskau 1953), S. 177.

into a four-membered ring ether, as well as by the fact a cyclic benzyldene acetal only formed from ecgoninol and not from *pseudo*-ecgoninol.

The third logical step for establishing the configurations of the ecgonines consisted of a direct proof of the position of the C_2 -COOCH₃ group in cocaine to the ring nitrogen. This was realized by intramolecular cyclization of N-carbamyl-*nor*-cocaine into an ureide.

The configuration of cocaine as 2 β -carbomethoxy-3 β -benzoxy-tropane, and that of psicaine as 2 α -carbomethoxy-3 β -benzoxy tropane, are therefore unequivocally proved. For the "third racemate" of ecgonine, the structure of 2 α -carboxy-3 α -hydroxy-tropane has been predicted, based upon its ready dehydration due to *trans*-elimination. The way to the synthesis of the two hitherto unknown diastereomers of cocaine is now disclosed.

In order to establish the configurations of the tropane alkaloids carrying oxygen function(s) at the ethylene bridge (scopolamine, oscine, valeroidine, meteloidine) theoretical deductions, as well as a new method, have been adopted.

(a) The ready conversion of scopolamine into oscine was interpreted in terms of an internal rearward nucleophilic attack of the *anti*-placed C₃-OH group toward the *syn*-placed epoxide ring at C_{6,7}. As a control of this deduction, hydrogenolysis of scopolamine into dl-3,6-

dihydroxy-tropane has been achieved; the levorotatory form of the latter proved identical with the alkaline form of valeroidine.

(b) All the alkaloids mentioned have at C₆₍₇₎ *syn*-placed oxygen function(s) to the ring nitrogen as indicated by the use of a new method. The tertiary bases were converted by means of ethyl iodoacetate into the quaternary salts of the lactones derived from N-carboxy-methyl-oscine, 3,6-dihydroxy-tropane and teloidine, respectively. These intramolecular bridge formations supply unambiguous evidence for the neighbourhood of the C₆₍₇₎ OH groups to the ring N or, more strictly speaking, to the unbound electron pair of this atom.

The selective and "reverse" quaternization of tropines has been interpreted in terms of the Pitzer effect of the ethylene bridge upon the N-CH₃ group, which favours the position of this group as inclining to the piperidine ring. The quantummechanical concept of the tetrahedral valency orientation of tricovalent nitrogen was taken into consideration.

It is hoped that the investigations reported may help to make possible a more profound analysis of the mode of action of tropane alkaloids of different steric structure on the appropriate bioreceptors. Perhaps the shape of prosthetic groups of some of these receptors may also be visualised on the basis of the knowledge of the morphology of these reactants.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Electron Microscopy of the Bone Ground Substance Using the Pseudo-Replica Technique

The ultrafine morphology of the bone ground substance and its relationship to the inorganic or crystalline fraction, has been so far incompletely investigated by electron microscopy. The problem has already been approached by one of us (ASCENZI¹, ASCENZI and BENEDETTI²) observing bone tissue treated in the Waring blender.

In order to bring a more adequate contribution to this subject, a specific study has been carried out using the pseudo-replica technique (see WYCKOFF³) so that a very thin layer of material is directly investigated.

Material and method.—From ox femur diaphysis (fresh or fixed in 10% formol solution), rectangular samples (5 × 1 × 1 cm) were prepared, the maximal dimension of which being orientated parallel to the longitudinal axis of the bone.

The pseudo-replicas were prepared as follows:

- (1) One surface of the sample was highly polished.
- (2) The surface was etched either with a 1% HNO₃ solution, or with a 0.5% trypsin solution, pH 8.5, at 37°C. The optimal time was 10 s for HNO₃ and 45 min for trypsin.
- (3) The surface was washed with distilled water and allowed to dry.
- (4) The surface was metal-shadowed by oblique evaporation of chromium.
- (5) A Formvar solution (500 mg Formvar in 100 ml dioxan) was dropped on to the surface and the excess liquid was drained off. Then the film was allowed to dry thoroughly.
- (6) Some isolated drops of gelatine solution (10 g gelatine in 80 ml water) were placed on the formvar film and allowed to dry. The shrinking of the dried gelatine drops facilitated the stripping off of the pseudo-replica.
- (7) The pseudo-replica was stripped off at the level of the gelatine drops using a very fine knife.
- (8) The pseudo-replica together with the gelatine drops was then floated (replica side up) on hot distilled water at 60°C. In this way only the gelatine drops were removed.

¹ A. ASCENZI, Rendic. Ist. super. San. 12, 893 (1949).

² A. ASCENZI and E. L. BENEDETTI, Arch. Sci. biol. 38, 234 (1954).

³ R. W. G. WYCKOFF, *Electron Microscopy, Technique and applications* (Interscience Publ., New York, 1949).

(9) Finally the pseudo-replica, floating face up, was mounted on the supporting disc of the electron microscope.

For examination of unetched bone surface, the second and third steps were omitted.

We obtained somewhat sharper structural details using Kossa's method of staining after step 3, the bone surface being etched with HNO_3 solution.

The pseudo-replicas were examined under the electron microscope of the "Istituto Superiore di Sanità" in Rome.

Results. (A) In pseudo-replicas of unetched bone, the calcified ground substance has a poorly granulated structure (see also ROUILLER, HUBER, and RUTISHAUSER¹). No crystalline features can be observed (see also RUTISHAUSER and MAJNO²).

(B) In pseudo-replicas obtained from bone previously etched with HNO_3 (Fig. 1), the ground substance is made up of small globules or particles apparently spherical in shape. The particles are frequently arranged either end to end, building up single fibres, or side to side, forming a two or three-dimensional network. It is possible to demonstrate a relationship between the globules of the ground substance and the collagen fibres. In Figure 2

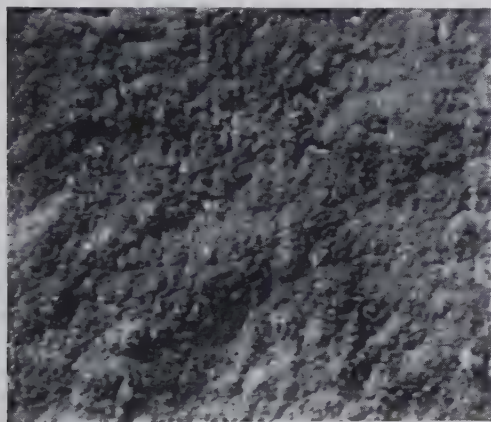


Fig. 1.—Magnification, 36,000 $\times$.

(left and downwards) the globules appear aligned in agreement with the collagen period. The diameter of single globules ranges from 200 to 250 Å.

The above-mentioned features of the ground substance can also be observed in preparations of decalcified bone treated in the Waring blender (ASCENZI and BENEDETTI³).

(C) Pseudo-replicas prepared from bone previously digested by trypsin show a structure consisting of a very fine framework (Fig. 3A). The meshes are irregular in shape and delimit spaces from 200 to 250 Å in diameter. The thickness of the single meshes is about 150 Å. This particular structure can be regarded as that of the inorganic bone fraction obtained after removal of the ground substance by trypsin digestion. No evident crystalline features could be detected anywhere.

The pseudo-replica pattern is very similar to the structure of the trypsin-digested bone, directly observed

under the electron microscope. In fact, Figure 3B shows a thin fragment of digested bone which was accidentally removed from the sample in stripping off the replica; its structure has the appearance of a very fine framework delimiting round spaces. The latter can be regarded as the spaces previously occupied by the spherical granules of the ground substance.

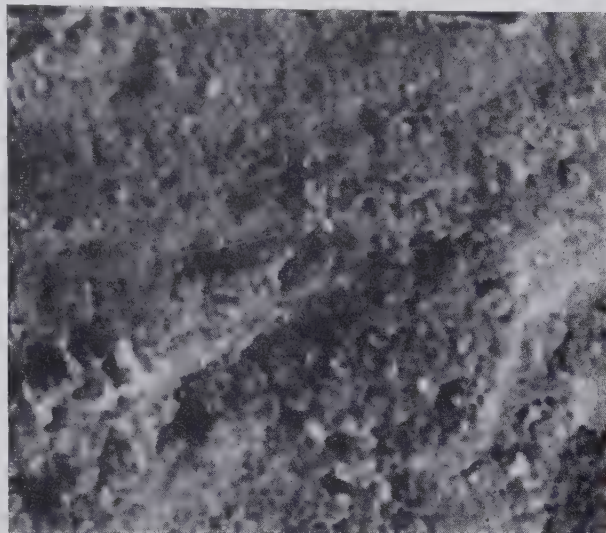


Fig. 2.—Magnification, 42,000 $\times$. The preferential oblique orientation (from above to bottom and from left to right) of the organic ground substance appears to correspond to the collagen period.

(D) Pseudo-replicas obtained from bone digested by trypsin and stained with Kossa's method, demonstrate a very fine framework, similar in every respect to that of pseudo-replicas from unstained bone but somewhat sharper.

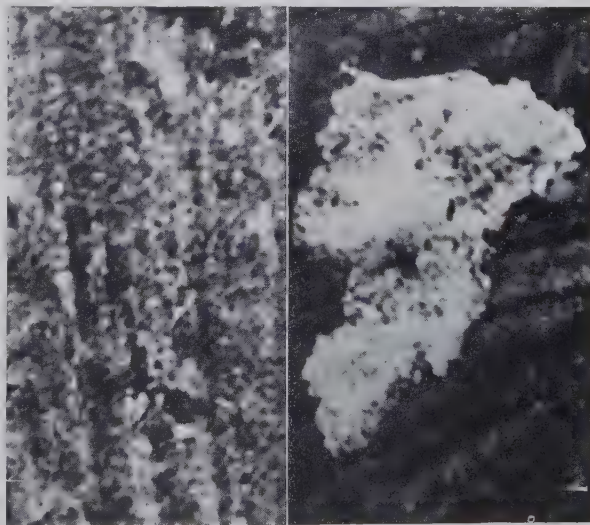


Fig. 3.—Magnification, 40,000 $\times$.

¹ CH. ROUILLER, L. HUBER and E. RUTISHAUSER, *Acta anat.* 16, 16 (1952).

² E. RUTISHAUSER and G. MAJNO, *Bull. Hosp. Joint. Dis.* (H. L. JAFFE, anniversary volume) 12, 468 (1951).

³ A. ASCENZI and E. L. BENEDETTI, *Arch. Sci. biol.* 38, 234 (1954).

Conclusion.—With the pseudo-replica method, we have shown that the calcified ground substance of bone has a granular structure due to the organic ground substance enclosed in the meshes of a very fine framework deriving from the inorganic fraction. The granules of organic

ground substance show an orientation which corresponds to the period of collagen fibres.

A. ASCENZI and A. CHIOZZOTTO

Institute of Anatomia Patologica, University of Rome, and Istituto Superiore di Sanità in Rome, August 26, 1954.

Résumé

Les auteurs ont étudié au microscope électronique, au moyen de la technique de la pseudo-empreinte, la structure de la substance fondamentale calcifiée d'os à structure lamellaire (fémur de bovidé). Ils ont pu ainsi démontrer que cette substance est formée de globules de nature organique, enclavés dans un fin réseau inorganique. Le diamètre des globules, ainsi que celui des mailles du réseau inorganique, est de l'ordre de 200–250 Å. Les globules organiques sont alignées parallèlement aux fibrilles collagènes.

The Exchange of Bone Calcium with Ca^{45} ¹

Introductory Background. (1) It is well established that KOH-glycol ashed bone will exchange calcium ions when suspended in a calcium solution tagged with Ca^{45} ². When equilibrium is obtained 14–15% of the bone calcium is found to enter into the exchange reaction³.

(2) Calcium phosphates with Ca/P weight-ratios ranging from 1.72 to 2.26 have been described as a series of defect pseudo-apatites with more or less calcium occupying lattice positions⁴. It is possible to fill these missing positions by suspending the material in lime solution⁵. These pseudo-apatites differ chemically and physically from true hydroxyapatite despite the fact that their X-ray diffraction patterns are similar. The compound with the greatest Ca/P (2.26) is similar to the principal inorganic component of bone.

If we prepare this calcium phosphate (Ca/P = 2.26) by suspending a defect pseudo-apatite in lime solution, the various types of calcium ions in the resulting solid are:

- (a) the original 9 Ca ions stoichiometrically bound to the phosphates groups,
- (b) the additional $1\frac{1}{2}$ Ca ions included in some manner in the pseudo-apatite of Ca/P = 2.26,
- (c) moreover, especially in the case of bone salts, some physically adsorbed Ca ions.

¹ This work was sponsored by the *Air Research and Development Command*, United States Air Force, through its European Office: contract n° AF 61(514)-647 C, and the Centre Interuniversitaire des Sciences Nucléaires of Belgium.

² H. C. HODGE, Proc. Metabolic Interrelations Conference (J. Macy Jr. Ed., New York, 1949, p. 49. – W. F. NEUMAN, Proc. Metabolic Interrelations Conference (J. Macy Jr. Ed., New York, 1950), p. 32. – M. FALKENHEIM, E. E. UNDERWOOD, and H. C. HODGE, J. Biol. Chem. **188**, 805 (1951). – E. E. UNDERWOOD and H. C. HODGE, J. Dent. Res. **31**, 64 (1952). – W. MINDER and T. GORDONOFF, Schweiz. Med. Wschr. **63**, 825 (1953). – W. F. NEUMAN, Chem. Rev. **53**, 1 (1953).

³ H. C. HODGE, Proc. Metabolic Interrelations Conference (J. Macy Jr. Ed., New York, 1949), p. 49. – M. FALKENHEIM, E. E. UNDERWOOD, and H. C. HODGE, J. Biol. Chem. **188**, 805 (1951).

⁴ A. S. POSNER, C. FABRY, and M. J. DALLEMAGNE, Biochim. Biophys. Acta **15**, 304 (1954). – M. J. DALLEMAGNE, C. FABRY, and A. S. POSNER, J. Physiol. **126**, 18 (1954).

⁵ C. FABRY, Biochim. Biophys. Acta **14**, 401 (1954); *ibidem* 1954 (in print).

(3) Hydrochloric acid can preferentially dissolve the Ca ions bound to the carbonate in bone¹. In the first stages of the acid action, the Ca/P ratio of the liquid phase is very high, decreasing slowly as the fundamental phosphate (Ca/P = 1.94) goes into solution. The action of HCl on bone is just the reverse of adding Ca from lime solution to a defect calcium phosphate as above. Unfortunately, this acid action is not quite selective and it is not possible to dissolve the calcium ions which fill the defects without destroying the fundamental tricalcium phosphate to some extent.

Experimental procedure. Combining the techniques of radioactive exchange and HCl attack, we were able to obtain information regarding the nature of exchangeable calcium in bone mineral. The starting material for our experiment was KOH-glycol ashed bone which was exposed for a month to $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ solution and then filtered and dried to constant weight at 105°C. The specific activity of this stock bone ash was 9.48×10^3 . Fractions of this material (500 mg) were suspended for 10 min in 25 ml of varying HCl solutions. The amount of HCl ranged from 0.2 mE to 6.25 mE. The amount of HCl sufficient fully to dissolve 500 mg of bone ash was 6.85 mE. After filtration and drying at 105°C, each sample was weighed; the calcium, phosphorus and specific activity were determined for both the liquid and residual solid phase. See Table for a tabulation of the results.

Results and discussion. The weight loss of the samples in HCl solution increased with the increase of HCl employed. As the HCl concentration increased, the specific activity of the liquid, very high for the small HCl quantities, decreased. However, the specific activity was always higher in the liquid than in the corresponding residual solid phase. For each experiment, the liquid phase always contained more calcium than required for 9 Ca per 6 P (Ca/P = 1.94). This excess represents the additional Ca ion content of bone structure. On the other hand, the Ca/P weight-ratio in the solid phase decreased slowly until it reached a value of 1.98.

Instead of regarding the ratio (counts/m)/total Ca, which decreases in both phases, we can calculate the ratio: (counts/m)/excess Ca. This turns out to be a constant value (61.9 ± 5.2) independent of the extent of HCl attack on the solid.

We feel that the Ca^{45} exchanged by bone mineral is exclusively the excess $1\frac{1}{2}$ moles of calcium of the saturated pseudo-apatite. These calcium ions are not only on the surface, but are contained in the structure of the solid, for they are still present after severe HCl attack. This is supported by a recent experiment in this laboratory which studied the uptake of Ca^{45} by a defect pseudo-apatite of Ca/P = 1.94. The material was dried at 105°C and exposed to a solution containing low calcium concentrations. Only pseudo-apatites with a Ca/P greater than 1.94, such as bone, can exchange in the presence of small Ca concentrations.

The exchange reaction of the Ca in excess of 9 moles per unit cell in bone mineral is rapid, with $\frac{3}{4}$ of the equilibrium value being attained in 10 min and full equilibrium being attained in a few hours. Thus these excess Ca positions do not behave chemically in the same way as the original 9 Ca ions of the fundamental neutral phosphate.

¹ M. A. LOGAN and H. L. TAYLOR, J. Biol. Chem. **125**, 391 (1938). – R. KLEMENT, Z. physiol. Chem. **184**, 132 (1929). – R. KLEMENT and G. TRÖMEL, Klin. Wschr. **12**, 292 (1933). – M. J. DALLEMAGNE and J. MELON, Arch. internat. Physiol. **58**, 188 (1950). – P. CARTIER, Bull. Soc. Chim. Biol. **30**, 65 (1948).

Table

Liquid Phase							
HCl mE/ 100 mg	% dissolved material	Ca mg	P mg	Ca/P	Excess Ca mg	c/m total Ca	c/m excess Ca
0.04	5.1	0.96	0.20	4.80	0.57	30.6	50.9
0.1	7.9	2.42	0.70	3.30	1.07	24.3	55.1
0.2	15.4	5.09	1.91	2.66	1.38	17.57	64.5
0.4	30.1	10.54	4.22	2.50	2.36	14.4	64.4
0.6	43.4	15.84	6.66	2.38	2.90	12.3	67.2
0.8	59.1	21.71	9.35	2.32	3.58	11.36	68.9
1.0	70.6	26.54	11.31	2.35	4.60	10.13	60.0
1.25	91.5	33.51	14.64	2.28	5.11	9.95	65.3
Solid Phase							
HCl mE/ 100 mg	% non dissolved material	Ca mg	P mg	Ca/P	Excess Ca mg	c/m total Ca	c/m excess Ca
0.04	94.9	35.13	15.74	2.22	4.60	7.83	61.4
0.1	92.1	33.67	15.24	2.21	4.10	8.19	65.1
0.2	84.6	31.00	14.03	2.21	3.78	8.13	65.1
0.4	69.9	25.55	11.72	2.18	2.81	7.35	63.0
0.6	56.6	20.25	9.28	2.18	2.25	6.98	61.0
0.8	40.9	14.38	6.59	2.18	1.60	6.29	55.6
1.0	29.4	9.55	4.63	2.06	0.57	6.08	—
1.25	8.5	2.58	1.30	1.98	0.06	5.04	—

All milligram values are calculated for 100 mg of bone mineral treated by HCl.

A certain amount of Ca in bone, above the 10½ mole value, is simply physically adsorbed (± 0.2 mg %). This exchanges very rapidly and reaches equilibrium with a Ca⁴⁵ solution in a few minutes. Mineralized bone always achieves a higher specific activity than the same material leached with a small quantity of HCl (0.02 mEHCl/100 mg ash dissolves all the surface adsorbed Ca) when both are immersed in like solutions of Ca⁴⁵. Quantitatively this may be seen as follows: (a) after a long time: untreated bone mineral, specific activity = 9.13, leached bone 8.63; (b) after short exposure: untreated bone mineral 0.86 and 0.74, leached bone 0.63 and 0.59 respectively.

Conclusions. The exchangeable Ca of KOH-glycol ashed bone (dried at 105°C) is only the adsorbed calcium and the ions located at the tenth and the tenth and a half Ca positions in the pseudo-apatitic structure. These calcium ions correspond to about 15 % of the total bone calcium which is in agreement with the percent exchange reported in the literature.

M. J. DALLEMAGNE,
CLAUDINE FABRY, and P. BODSON

Institute of Experimental Therapeutics, University of Liège, Belgium, December 23, 1954.

Résumé

L'emploi combiné de l'isotope radioactif du calcium et de la dissolution progressive des sels osseux par HCl a permis de démontrer que le calcium échangeable de la substance minérale osseuse correspond au calcium adsorbé et à celui qu'elle renferme en excès par rapport au phosphate tricalcique fondamental.

Microradiographic Studies of Teeth

In 1933 the first interesting attempt was made to study teeth by means of the microradiographic technique¹. On account of the coarse graining in the film used, the lack of sensitivity of the apparatus and the poor power of resolution by modern standards, the radiogram could only show the coarsest structures².

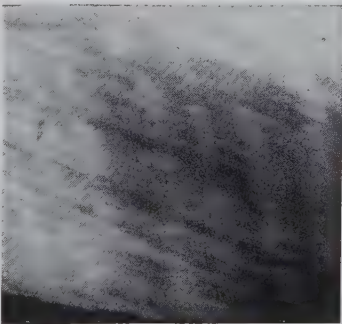


Fig. 1.—Enamel: Retzius' lines (horizontally) and the bands of Hunter-Schreger (vertically). 100 ×.

The pictures below are of ground sections (15–25 μ) of adult healthy teeth photographed by X-rays with wavelengths 2.4–4.0 Å. Calcium has the maximum absorption at 3.06 Å³. A Machlet type AEG 50 X-ray

¹ E. APPLEBAUM, F. HOLLANDER, and C. F. BÖDECKER, *Dental Cosmos* 75, 1097 (1933).
² E. APPLEBAUM, *Dental Cosmos* 77, 931 (1935); 78, 969 (1936); *J.-Dental Res.* 19, 41 (1940); 22, 7 (1943); *Ann. Dent.* 7, 1 (1948). — F. HOLLANDER, C. F. BÖDECKER, E. APPLEBAUM, and E. SAPER, *Dental Cosmos* 77, 12 (1935). — F. HOLLANDER, *Dental Cosmos* 78, 1143 (1936).
³ M. SIEGBAHN, *Spectroscopie der Röntgenstrahlen* (Berlin, 1924).

tube (1 mm Be filter) has been used with fine grain Lippman Film.

By this method the radiograms enable one to perceive a greater resolution than has been possible before. The pictures show chiefly the distribution of the calcium in the different structures of the teeth. The white areas represent the parts rich in calcium and the dark areas show the parts which have less calcium and more organic substance¹.

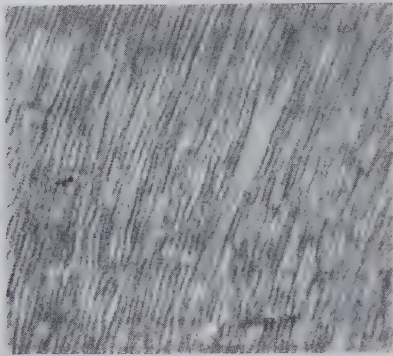


Fig. 2.—Dentin: Dentinal tubules which appear as black lines (long section). 200 $\times$.

The microradiograms of the ground sections of enamel (Fig. 1) clearly show Retzius' lines which seem to be formed by rhythmical mineralisation. In the picture they go horizontally. One can even see the Hunter-Schreger bands which go vertically in the picture. These bands indicate that there is rhythmical calcification and their appearance is probably not due to an optical phenomenon which some authors assert².

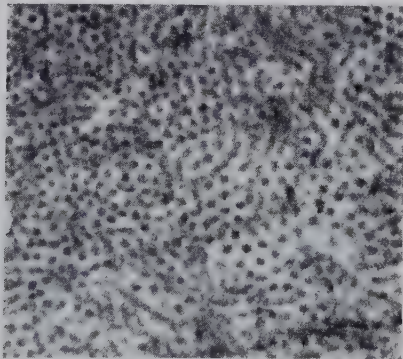


Fig. 3.—Dentin: Dentinal tubules in cross section. 200 $\times$.

In the X-ray pictures of dentin, the dentinal tubules containing protoplasmic processes of the odontoblasts, Tomes' fibers, may be seen. They do not absorb the X-rays and are probably not mineralised and therefore appear as dark threads or points in longitudinal and cross section, respectively (Fig. 2 and 3). In dentin even the rhythmical mineralisation in the shape of von Ebner's lines appears.

On the dentin-enamel junction a characteristic wavy shape may be seen in many places in many of the teeth

¹ R. AMPRINO and A. ENGSTRÖM, *Acta Anatomica* 15, 1 (1952). – A. ENGSTRÖM, *Acta Radiol.* 31, 503 (1949). – A. ENGSTRÖM and S. WELIN, *Acta Radiol.* 31, 483 (1949). – A. ENGSTRÖM and R. AMPRINO, *Exper.* 6, 267 (1950). – A. ENGSTRÖM and L. WEGSTEDT, *Acta Radiol.* 35, 345 (1951). – A. ENGSTRÖM and B. ENGELFELDT, *Exper.* 9, 19 (1953).

² ORHAN, *Oral Histology and Embryology*, 1949, 60.

as well as enamel tufts which appear to contain about as much calcium as dentin.

The cementocytes in the cellular cementum are not mineralised and do not absorb the X-rays. Consequently these cells appear as black points in contrast to their surroundings.

The figures show the preliminary results of the experiments designed to establish the quantitative distribution of calcium in the different structures of the tooth. Quantitative data and a detailed report will be published later.

H. RÖCKERT

Department of Histology, Medical Faculty, University of Göteborg, October 3, 1954.

Zusammenfassung

Mit Röntgenstrahlen, deren Wellenlängen dem engbegrenzten Absorptionsmaximum von Calcium entsprachen, wurden von Schleifsnitten adulter, normaler menschlicher Zähne Mikroradiogramme aufgenommen. Diese geben Aufschluss über das Vorkommen von Calcium in menschlichen Zähnen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an lebenden Bakterien mit Hilfe des Abdruckverfahrens

Elektronenmikroskopisch lassen sich nur sehr dünne Objekte (0,1 μ) durchstrahlen. Sind die Objekte nicht von Natur aus so dünn, oder reicht Umrissabbildung nicht aus, so kann man zu Dünnschnitten (200 bis 1000 $\text{\AA}$) greifen¹ oder zu Oberflächenabdruckverfahren wobei die Objekte beliebig kompakt sein dürfen. Letztere, von H. MAHL eingeführte und in zahlreichen Varianten angewandte mittelbare Methode liefert das Oberflächenrelief des Objektes mit einem Auflösungsvermögen von etwa 60 bis 150 $\text{\AA}$ ².

Die bisherigen Untersuchungen mit Abdruckverfahren bezogen sich im wesentlichen auf fixiertes Material³. Es wurde daher der Versuch unternommen, das Oberflächenabdruckverfahren bei lebenden Bakterien, die auf ihrem natürlichen Nährsubstrat verblieben, anzuwenden. Dabei wurde erwartet, dass Einzelheiten über Oberflächenstrukturen und Begeißelung erkennbar werden würden, die sonst bei der üblichen Präparationsweise (Abschwemmen, Zentrifugieren) leicht verlorengehen oder artifiziellen Veränderungen unterworfen waren⁴.

Die untersuchten Bakterien wurden auf möglichst weitflächig beimpften 2%igen, zuweilen auch auf

¹ Zum Beispiel: D. C. PEASE und R. F. BAKER, *Proc. Soc. Exp. Biol. med.* 67, 470 (1948). – L. H. BRETSCHNEIDER, *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterdam* 52, 1 (1948); 53, 9 (1950). – F. S. SJÖSTRAND, *Exper.* 9, 114 (1953).

² Zum Beispiel: H. MAHL, *Naturwissenschaften* 30, 207 (1942). – F. KRAUSE und H. MAHL, *Kolloid-Z.* 193, 53 (1943). – H. MAHL, *Ergeb. exakten Naturwissensch.* 12, 262 (1945).

³ A. KLEINSCHMITT und E. KINDER, *Zbl. Bakt. I. Orig.* 156, 219 (1950). – A. KLEINSCHMITT, *Z. Tropenmedizin und Parasit.* 2, 507 (1951). – A. KLEINSCHMITT und F. SCHLEICH, *Z. Tropenmed. Parasit.* 3, 42 (1951). – E. KELLENBERGER und L. HUBER, *Exper.* 9, 289 (1953). – J. HILLIER und R. BAKER, *J. Bact.* 52, Nr. 4 (Okt. 1946).

⁴ Diese methodischen Fragen tauchten auf im Rahmen von Untersuchungen W. LUDWIGS und Mitarbeitern, darunter der eine Verfasser (SCHRELL), Zoologisches Institut Heidelberg, über rechts- und linksgewundene Stämme von *Bacillus mycoides* und die künstliche Invertierbarkeit deren Asymmetrieform (R-L-Problem)⁵.

⁵ U. HETTENBACH und W. LUDWIG, *Exper.* 7, 457 (1951).



Abb. 1. *Shigella paradysenteriae*. Palavit-Sio-Abdruck von Agarkultur, 20 h bei Zimmertemperatur bebrütet, Nährboden 1,5%ig. Abdruck mit Trypsin verdaut. Vergrößerung: 15000:1.

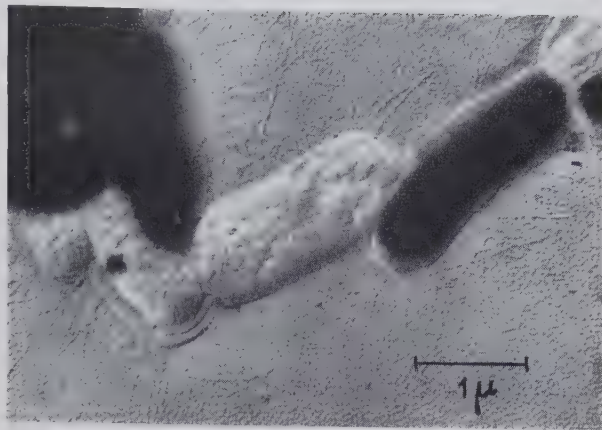


Abb. 2. *Escherichia coli*. Palavit-Sio-Abdruck von Agarkultur, 9 h bei 37° bebrütet, Nährboden 2%ig. Abdruck mit Festal verdaut. Vergrößerung: 15000:1.

1½%igen Fleischbrühe-Pepton-NaCl-Agarplatten von einem pH = 7,4 bei 37°C 4–24 h bebrütet. Danach wurden die Platten mit einem flüssigen Kunststoff begossen und dieser nach seinem Erstarren von der Agarfläche abgehoben.

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen haben sich zwei Kunststoffe als besonders brauchbar erwiesen: Polystyrol¹ und als unseres Wissens neuartig in der Elektronenmikroskopie Palavit². Während Polystyrol mit Benzol verflüssigt durch Verdunsten seines Lösungsmittels erst in 12 bis 24 h eine Abdruckmatrize bildet, erstarrt das Palavit durch den Polymerisationsvorgang in 5 bis 8 min³. Ein Teil der Bakterien haftete in der Regel am Abdruck und musste mit verschiedenen Verdauungsfermenten herausverdaut werden. Von den handelsüblichen Fermentsystemen erwies sich vor allem Festal⁴ als wirksam, doch konnte auch mit aktiviertem Papain⁵ und Trypsin-Pepsin-Verdauungen erfolgreich gearbeitet werden. Gleichmässige Verdauungserfolge wurden bisher nicht erzielt, eine weitere Untersuchung hierüber ist vorgesehen. Die der Verdauungsflüssigkeit entnommenen Abdruckfolien wurden im kräftigen Wasserstrom durch Stunden hindurch gespült und schliesslich an der Luft getrocknet.

Nunmehr wurden diese Kunststoffmatrizen nach dem bekannten Verfahren⁶ im Hochvakuum zur Erhöhung der Kontrastwirkung mit Platin oder Paladium schräg und mit Siliziummonoxyd senkrecht bedampft. Die Aufdampfschichten konnten mit Hilfe der Gelatine-methode⁷ abgehoben werden.

Abbildung 1 zeigt einen Oberflächenabdruck von *Shigella paradysenteriae*, die Abbildungen 2 und 3 solche von *Escherichia coli*, die zum Teil unvollkommene Verdauung erkennen lassen. Über die in den Abbildungen 2 und 3 sichtbar gewordenen Geisselstrukturen, die bisher nicht bekannt waren, mögen Erörterungen vorerst unterbleiben. Jene Geisselorganellen, die auf der dem Beschauer zugekehrten Seite inserieren, sind zunächst auf dem Bakterienkörper aufgeklatscht und treten dann

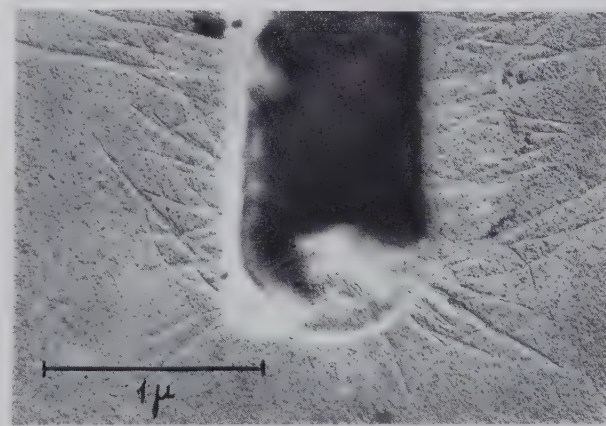


Abb. 3. *Escherichia coli*. Palavit-Sio-Abdruck von Agarkultur, 12 h bei 37° mit Coliphage 2 bebrütet, Nährboden 1,5%ig. Abdruck mit Festal verdaut. Vergrößerung: 30000:1.

Die hier beschriebene Methode der Gewinnung von Lebendabdrücken dürfte wohl einen präparativen Fortschritt darstellen. Den Schäden bisheriger Präparationen¹ stehen bei oben beschriebener Methode möglicherweise geringere durch die flüssigen Kunststoffe gegenüber. Beide verwandten Kunststoffe sind wasserabstossend, das schnell erstarrende Palavit scheint früher fest zu werden als die Zelle abstirbt und sich dabei verändert, es besitzt vermutlich keine fixierenden Eigenschaften, gelang es doch, von der Abdruckfolie lebendes Bakterienmaterial erfolgreich zu überimpfen.

¹ B. v. BORRIES, *Einführung in die Übermikroskopie* (Verlag Cantor, Aulendorf, Württemberg, 1949).

¹ Hersteller: B.A.S.F. Ludwigshafen/Rhein.

² Dentalmedizinisches Präparat von Kulzer & Co. (Frankfurt a.M.) auf Plexiglasbasis.

³ A. F. BROWN und W. M. JONES, *Nature* 159, 635 (1947).

⁴ Farbwerke Hoechst, Frankfurt a.M.-Hoechst.

⁵ W. SCHWARZ und G. PAHLKE, *Z. Zellf.* 38, 475 (1953).

⁶ Zum Beispiel R. D. HEIDENREICH und V. G. PECK, *J. Appl. Phys.* 14, 23 (1943).

⁷ E. KINDER, *Phys. Verhandl.* 4, 102 (1953).

Wir danken Herrn Regierungsrat Dr. G. A. KAUSCHE für freundliche Unterstützung und Herrn Dozent Dr. G. POETSCHKE und Herrn Dr. med. dent. F. FLOTTMEIER für ihre Ratschläge. Elektronenoptische Aufnahmen: Zeiss-Gerät EM 8.

W. SCHREIL und F. SCHLEICH

Institut für Virusforschung, Heidelberg, und Gastlaboratorium der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Württemberg, Abteilung für Elektronenoptik, den 24. August 1954.

Résumé

Au moyen d'une technique nouvelle, fondée sur l'emploi de matières plastiques (Polystyrol et Palavit), l'auteur obtient d'excellentes images de la surface de bactéries vivantes cultivées sur agar-agar. Grâce à cette méthode il est possible de mettre en évidence des structures qui n'avaient pas été décrites jusqu'à ce jour, le «double moulage» restituant fidèlement les détails caractéristiques de l'original.

Über die Wirkung der chronischen Colchicinvergiftung auf experimentelle Mykosen

Unter den Stoffen, die die Ausbreitung einer experimentellen Mykose begünstigen, bzw. ihre Abheilung verzögern, kommt dem Cortison nach den Berichten verschiedener Autoren¹, sowie eigenen Untersuchungen² eine gewisse Bedeutung zu. Wenn sich auch über den Mechanismus dieses Geschehens bisher nur Vermutungen anstellen lassen, so ist doch so viel sicher, dass eine Generalisation nur bei Verwendung pathogener Stämme erfolgt, während apathogene auch unter Cortison keine Pathogenität erlangen. Selbst bei solchen von nur geringer Pathogenität gibt Cortison nicht immer einen Impuls zur Ausbreitung, wie wir an der experimentellen Chromoblastomykose zeigen konnten³.

Die Ähnlichkeit der Angriffsorte von Cortison und Colchicin, besonders auf Knochenmark und RES, gaben uns Veranlassung, auch das Colchicin in seiner Wirkung auf experimentelle Mykosen zu untersuchen. Da uns negative Vorversuche bei der Histoplasmose der Ratte davon überzeugten⁴, dass mit einer akuten Colchicinvergiftung keine brauchbaren Resultate zu erhalten waren, haben wir uns der chronischen Vergiftung nach der Methode von MATKO und HARASZTI⁵ zugewandt, die eine ausreichende Überlebenszeit zur Beobachtung der behandelten Tiere gewährleistet.

Versuchsmaterial und Methode. Nachdem Vorversuche erwiesen hatten, dass eine morphologisch fassbare Schädigung des Knochenmarks bei der Ratte nach etwa 10 Tagen einer Colchicinverabreichung von 35 bis 50 γ je 100 g (täglich oder jeden 2. Tag) eintritt, wurde der 10. Tag zur Inokulation ausgewählt. Die Veränderungen im Markabstrich aus dem unteren Femurdrittel bestanden in einer Linksverschiebung mit zahlreichen arretier-

ten Mitosen. Als Colchicin wurde Colchicinium puriss. Merck verwendet.

Im einzelnen wurde so vorgegangen, dass von drei Gruppen zu je 10 Albinoratten, mit einem Durchschnittsgewicht von 60 g bei Versuchsbeginn, jeweils 5 Tiere mit einer wässrigen Colchicinlösung in der oben angegebenen Dosierung behandelt wurden. Die Lösung wurde intraperitoneal gespritzt, da nach subkutaner Injektion häufig lokale Nekrosen auftraten. Am 10. Tag der Colchicinbehandlung wurden Versuchstiere und Kontrollen auf intraperitonealem Wege infiziert. Die Colchicinverabreichung wurde bis zum Versuchsende am 30. Tag *post infectionem* fortgesetzt. Zur autopsischen und histologischen Untersuchung gelangte je ein Tier der Versuchs- und Kontrollgruppen am 7., 12., 18., 24. und 30. Tag nach der Inokulation. Als Kontrolle für die Colchicigruppe schliesslich wurden 10 intakte, nicht infizierte Ratten in gleicher Weise durch 40 Tage mit Colchicin behandelt. Es kann hier vorweggenommen werden, dass diese Tiere ausser den Erscheinungen einer chronischen Colchicinvergiftung keine pathologischen Veränderungen aufwiesen und den Versuch überlebten.

Als Pilzstämmen wurden verwendet: *Nocardia Leishmani*, *Nocardia asteroides* und *Torula histolytica*. Von den auf flüssigem Czapek-Dox-Medium unter Zusatz von 5 g Pepton-Proteose bei Zimmertemperatur gewachsenen, 14 Tage alten Kulturen wurden 0,1 cm³ abzentrifugiertes Kulturmaterial je 50 g Ratte i.p. gegeben.

Ergebnisse. *Nocardia Leishmani*. Dieser Stamm erwies sich für unsere Ratten als nur wenig pathogen, und die Krankheitserscheinungen beschränkten sich auf eine spärliche Aussaat kleinster Knötchen am viszeralem Peritoneum und Omentum. Nach dem 18. Tag war bei den Kontrollen kein pathologischer Befund mehr zu erheben.

Bei allen Colchicintieren dagegen fanden sich ausser am Peritoneum und Omentum auch am Zwerchfell bis zu einem Dutzend miliärer Knötchen, die mikroskopisch als mykotische Mikrogemmen anzusprechen waren. Die Knochenmarkabstriche bei diesen Tieren zeigten ein toxisch verändertes Mark mit zahlreichen Mitosen, Linksverschiebung und vereinzelt pyknotischen Kernen. Eine Ausbreitung der Infektion über die Bauchhöhle hinaus in den Brustraum und seine Organe unterblieb.

Nocardia asteroides. Die Pathogenität dieses Stammes war gegenüber der *Nocardia Leishmani* wesentlich grösser, aber auch hier liessen sich bei den nur infizierten Kontrollen deutliche Zeichen einer Selbstheilung beobachten. Die Zahl der mykotischen Granulome bei diesen Tieren betrug durchschnittlich 20–30, ihre Grösse 0,5–1 mm. Betroffen von der Aussaat waren Peritoneum und Omentum, und bei 3 Tieren bestanden zarte Adhäsionen zwischen Darmserosa und Bauchwand.

Im Gegensatz dazu waren die pathologischen Erscheinungen bei den Colchicinbehandelten ausgedehnter und massiver; die Adhäsionen plattenartig und derb, die Zahl der Knötchen bis zu 100 und darüber. Ihre Ausdehnung erstreckte sich vom Zwerchfell, das mit zahlreichen miliären Granulomen besät war, über den serösen Überzug von Milz und Leber auch in deren Parenchym und schliesslich abwärts bis ins Becken und den retroperitonealen Raum. In den Lungen fanden sich bei 2 Tieren vereinzelt miliäre Abszesse, jedoch ohne sicher nachweisbare Erreger. Wir möchten daher diese Herde nicht mit dem mykotischen Geschehen in Zusammenhang bringen. Die Veränderungen im Knochenmark waren proportional der fortschreitenden Colchicinvergiftung und zeigten gegen Versuchsende zahlreiche pyknotische Kerne und Rosettenformen.

¹ P. REDAELLI, C. CAVALLERO, M. BORASI, G. SALA und A. AMIRA, Exper. 7, 109 (1951). – C. CAVALLERO, Rev. Canad. Biol. 12, 189 (1953). – V. D. NEWCOMBER, E. T. WRIGHT, J. E. TARBET, L. H. WINER und TH. H. STERNBERG, J. invest. Dermat. 20, (1953). – C. E. SNOCK und G. MIESCHER, Bull. Schweiz. Akad. Wiss. 8, 220 (1952). – F. REISS und L. CAROLINE, J. invest. Dermat. 19, 365 (1952). – P. REDAELLI und L. PIANTONI, Giorn. Malatt. infett. 5, 77 (1953).

² H. KÖNIGSBAUER, Zbl. Bakt. Abt. I. 159, 473 (1953); 160, 637, (1954).

³ H. KÖNIGSBAUER, Zbl. Bakt. Abt. I. 160, 637 (1954).

⁴ H. KÖNIGSBAUER, Archiv Dermat. 195, 492 (1953).

⁵ L. MATKO und A. HARASZTI, Act. morph. Hung. 2, 219 (1952).

Torula histolytica. Der verwendete, nach einigen Rattenpassagen hochpathogene Stamm führte bei beiden Gruppen schon nach 14 Tagen zu massiven Erscheinungen im Bauch sowie zur Infiltration der Lungen. Trotzdem waren auch hier deutliche Unterschiede zwischen Versuchstieren und Kontrollen festzustellen.

Während nämlich bei den Kontrollen, abgesehen vom besseren Allgemeinzustand, die disseminiert oder gruppiert stehenden Knötchen in der Bauchhöhle immer scharf voneinander abgrenzbar waren, kam es bei den Colchicintieren zu einer diffusen Infiltration im Oberbauch, die das Omentum den subhepatischen Raum und den Milzhilus mit einer formlosen, sulzigen Torulamasse ausfüllte. Eine Abwehrreaktion wie bei den Kontrollen, in Form mykotischer Granulome, fehlte.

Als besonders interessante Einzelheit möchten wir erwähnen, dass bei zwei von den fünf Colchicintieren, die am 19. und 21. Tag eingingen, eine Pankreasnekrose mit Zerstörung des sekretorischen und inkretorischen Apparates beobachtet wurde. Nur vereinzelte Schaltstücke, eingebettet in Erregermassen, blieben erhalten. Bei einem weiteren Tier, das am 14. Tag getötet wurde, sahen wir den Beginn dieser Zerstörung, die von der Peripherie des Organs her schrittweise Drüsenläppchen und Inseln ergriff. Bei den Kontrollen waren wohl epitheloidzellige Granulome zwischen den einzelnen Drüsenläppchen vorhanden, das Organ selbst aber intakt. Im Knochenmarkabstrich fanden sich, ausser der üblichen Colchicinschädigung, vom 14. Tag an in zunehmendem Masse zahlreiche Hefen.

Besprechung der Ergebnisse. Wie die dargelegten Resultate zeigen, führt auch Colchicin, ähnlich wie Cortison, zur Ausbreitung und Intensivierung mykotischer Infektionen. Dabei fällt auf, dass sich die Wirkungsbreite von Colchicin auch auf die Infektion mit der nur wenig pathogenen *Nocardia Leishmani* erstreckte. Die Ergebnisse bei der Infektion mit *Nocardia asteroides* decken sich mit denen von REDAELLI¹. Der Genannte erzielte mit Cortison bei Mäusen eine Generalisation und Zunahme der pathologischen Erscheinungen. Bei der Torulose schliesslich sahen CAVALERO² und wir selbst³ unter Cortison ähnliche Zustandsbilder, die Pankreasnekrose ausgenommen.

Ob dieser Wirkung eine Schädigung der Abwehrmechanismen allein zugrunde liegt – Knochenmarkschädigung, Störungen im RES, Abnahme der Antikörper – oder ob auch hier endokrine Faktoren mit hineinspielen, muss einstweilen eine offene Frage bleiben. Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange und sollen zu gegebener Zeit veröffentlicht werden.

Addendum. Bei der Drucklegung unserer Untersuchungen erhielten wir Kenntnis der Arbeit von CL. HURIEZ et F. DESMONS, die über Behandlungsversuche mit Colchicosid, einem viel weniger toxischen Abkömmling des Colchicins bei verschiedenen Ekzemformen, berichten. Die genannten Autoren beobachteten bei zwei Fällen einer mikrobiellen Dermatitis, trotz gleichzeitiger Behandlung mit Penicillin, eine akute Verschlechterung des Krankheitsbildes, die zum Absetzen der Colchicosid-Therapie zwang. Dabei wird von ihnen auf die Ähnlichkeit der Wirkung von Colchicosid mit ACTH hingewiesen⁴.

H. KÖNIGSBAUER

Privat-Laboratorium für Mikrobiologie, Knittelfeld, Österreich, den 9. Juli 1954.

¹ P. REDAELLI und L. PIANTONI, Giorn. Malatt. infett. 5, 77 (1953).

² C. CAVALERO, Rev. Canad. Biol. 12, 189 (1953).

³ H. KÖNIGSBAUER, Zbl. Bakt. Abt. I. 160, 637 (1954).

⁴ Bull. Soc. franç. Dermat. 61, 114 (1954).

Summary

Rats injected intraperitoneally with colchicin, 35–50 μ per 100 g daily or every second day, were infected experimentally on 10th day with *Nocardia asteroides*, *Nocardia Leishmani* or *Torula histolytica*. Controls received no colchicin. Animals given colchicin showed diffusion of infection with numerous mycotic granulomes, similar to the results obtained with cortison.

Polarité électrique de fragments de Carotte cultivés *in vitro*¹

Quelques observations sur la polarité morphologique² et la croissance de fragments de Carotte cultivés *in vitro*³ nous ont engagés à en étudier la polarité électrique. A notre connaissance, cet aspect du problème de la polarité des cultures de tissus n'a pas encore été abordé.

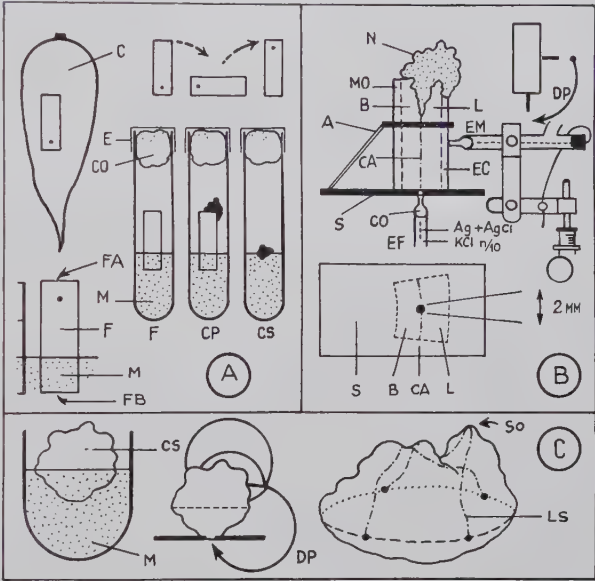


Fig. 1. C carotte; F fragment; CP culture primaire; CS culture secondaire; E étain; CO coton; M milieu; FA face apicale; FB face basale; N néoformation; MO moelle; B bois; CA cambium; L liber; EC écorce; A appui; S support; DP différence de potentiel mesurée; EF électrode fixe; EM électrode mobile; SO sommet; LS ligne de sondage.

Nous avons examiné des cultures primaires (CP, âge moyen 75 jours) et secondaires (CS, 52 jours), préparées selon la technique actuellement en usage, au laboratoire de M. GAUTHERET. Les fragments (3/1,5/1,5 cm), prélevés dans la région moyenne de carottes longues d'environ 10 cm, étaient placés en position renversée (Fig. 1A). Les différences de potentiel (DP) ont été mesurées selon la méthode décrite dans une autre publication⁴ (Fig. 1B); leur signe est pris par rapport au circuit extérieur.

¹ Grâce à un subside du Fonds national pour la Recherche scientifique, j'ai pu m'initier aux techniques récentes de culture de tissus dans le laboratoire de M. GAUTHERET, à Paris, que je remercie ici, ainsi que le Comité du Fonds (P.E.P.).

² R. J. GAUTHERET, C. r. Acad. Sci. 211, 15 (1940); Rev. Cytol. Cytophysiol. vég. 7, 45 (1944).

³ R. J. GAUTHERET, C. r. Acad. Sci. 210, 186 (1940); C. r. Soc. Biol. 144, 172 (1950).

⁴ P. E. PILET et S. MEYLAN, Bull. Soc. Bot. suisse 63, 430 (1953).

Les CS examinées, fragments de CP repiqués une seule fois, étaient volumineuses. Des 81 mesures, le long de deux méridiens (Fig. 1C), sur les 12 cultures dont nous disposons, 74 ont donné une DP négative; la moyenne générale est de -16 mV. Pour 11 des CS, la DP moyenne est négative, le maximum se situant au sommet de la culture. Des mesures sur les CS immédiatement renversées ont servi de contrôle du signe de la polarité. Nous avons ainsi constaté une «négativité» marquée des tissus en voie de prolifération de la CS par rapport à sa base¹. Cette observation, sous la réserve d'une action du milieu que nous examinons plus loin, confirmerait que les cellules en voie de division sont électro-négatives par rapport aux tissus voisins².

La CP, sortie, sans changement d'orientation, du milieu (dont on supprime toute trace sur le fragment) est posée sur le support horizontal S (Fig. 1B). L'électrode fixe (EF) est placée sur le cambium (surface de contact: $12,6$ mm²); l'électrode mobile (EM) est appliquée successivement en des niveaux précis et la DP mesurée. Quelque 300 déterminations (Fig. 2; 20 cultures), sans distinction du bois et du liber (les proliférations latérales ayant souvent empêché des mesures symétriques) autorisent les conclusions suivantes: 1° du bas vers le haut du fragment, la DP mesurée prend des valeurs négatives croissantes; 2° les proliférations cellulaires, au sommet de la CP, sont encore plus négatives, ce qui confirme les observations sur les CS.

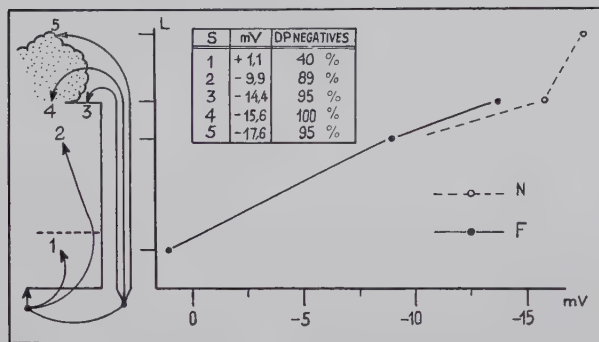


Fig. 2. S niveau de sondage; mV millivolts; F fragment; N néoformation

La polarité électrique constatée est-elle un effet de la présence des néoformations?, une expression de la polarité propre des tissus? ou la conséquence d'une action du milieu de culture? Des observations sur une soixantaine de fragments maintenus verticaux, dans des conditions diverses (position droite ou renversée; milieu habituel pour CP ou papier-filtre Durieux sans cendre, humide; EF sur la face inférieure, ou la supérieure), examinés 2-3 jours après leur préparation, fournissent les premiers éléments d'une réponse aux questions posées.

Dans tous les groupes (8-13 fragments), nous avons constaté une chute de potentiel du bas (7) vers le haut (3) du fragment. Une polarité électrique comparable à celle des CP existe donc dans les fragments avant l'apparition des néoformations, qui semblent ne modifier que peu l'état électrique des tissus, dans leur voisinage immédiat (Fig. 2).

¹ Quelques mesures sur des CS de Scorsonère ont donné une DP moyenne encore plus forte (-24 mV).

² J. B. THOMAS, Rec. Trav. Bot. néerl. 36, 373 (1939). – R. KELLER, Österr. Bot. Z. 97, 105 (1950).

Dans les fragments droits (face apicale en bas), comme dans les renversés, l'orientation de la polarité est la même, d'où l'hypothèse d'un facteur prépondérant de la polarité lié à l'orientation spatiale des fragments. L'orientation même de la polarité suggère l'idée qu'il pourrait s'agir d'un effet géoélectrique longitudinal, physique¹ ou vital². A supposer que la polarité électrique dépende d'autres facteurs, liés à la constitution même de la racine, ils devraient, semble-t-il, se manifester par le renforcement de l'effet de position dans l'une des orientations et sa diminution dans l'autre; la comparaison des DP mesurées sur les fragments droits et renversés devrait les mettre en évidence. Ces premières observations, sur des groupes trop peu nombreux, ne fournissent qu'un indice d'une diminution des DP sur les fragments renversés, trop peu constant pour que nous puissions déjà en faire état. On ne saurait d'ailleurs tirer d'un résultat négatif de simples essais de renversement la conclusion que la polarité électrique soit sans rapport direct avec la polarité morphologique, au sens large où on l'entend aujourd'hui, c'est-à-dire conditionnée dans une certaine mesure par la circulation des auxines³, que le renversement, en changeant l'importance relative des divers courants auxiniques, serait susceptible de changer aussi⁴.

Comparés aux fragments sur papier-filtre, les fragments au contact du milieu de culture présentent une région 1 fortement positive par rapport à la base; la chute de potentiel de 1 vers 3 y est aussi plus abrupte. Cet effet est plus marqué dans le bois que dans le liber, donc vraisemblablement attribuable à des phénomènes de diffusion; des dosages, à différents niveaux, des composants du milieu, seraient nécessaires pour en avoir confirmation⁵. Ce même effet pourrait rendre compte des DP relativement fortes observées sur les CS hautes de 1-2 cm seulement.

Ces observations préliminaires, que nous nous proposons de reprendre avec un matériel plus abondant, ne donnent pas d'indication permettant de conclure déjà à l'existence d'une relation entre la polarité électrique des fragments témoins et la localisation des néoformations sur les fragments cultivés *in vitro*.

P. E. PILET et SUZANNE MEYLAN

Institut de botanique de l'Université de Lausanne, le 10 décembre 1954.

Summary

The determination of PD's on carrot fragments growing *in vitro* has shown an electrical polarity of primary and secondary cultures of these tissues. The neoformations are negative in relation to the basis of the fragment. Controls, whether turned upside down or not, exhibit a similar polarity, which is influenced by the medium. The relation between electrical and morphological polarity cannot be stated at present.

¹ L. BRAUNER, Jb. wiss. Bot. 66, 381 (1927); 68, 711 (1928); Rev. Fac. Sci. Istanbul 7, 46 (1942). – L. BRAUNER et H. U. AMLONG, Protoplasma 20, 279 (1933).

² A. R. SCHRANK, dans E. J. LUND et coll. Bioelectric Fields and Growth (The University of Texas Press, Austin 1947), pp. 75-123.

³ A. TH. CZAJA, Ber. dtsh. bot. Ges. 53, 197 (1935). – R. A. OLSON et H. G. DU BUY, Amer. J. Bot. 24, 611 (1937). – G. HELLINGA, Med. Landbouwhoogschool (Wageningen) 41, 1 (1937). – W. P. JACOBS, J. Bot. 39, 301 (1952).

⁴ P. E. PILET, Mém. Soc. vaud. Sci. nat. 10, 137 (1951); Bull. Soc. Bot. suisse 61, 410 (1951); Phytion (Austria) 4, 247 (1953).

⁵ L'accumulation du glucose (composant essentiel du milieu) dans les tissus de Carotte cultivés *in vitro* a été relevée, par exemple, par R. J. GAUTHERET, C. r. Acad. Sci. 211, 15 (1940); Rev. Cytol. Cytophysiol. vég. 7, 45 (1944).

Recherches sur les greffes de méristèmes
de *Pisum*

Il est possible de greffer le point végétatif apical de *Pisum* sur un méristème radiculaire cultivé isolément dans un milieu synthétique stérile. La plante ainsi reconstituée reste en vie durant 3 semaines environ¹. Nous avons admis qu'une incompatibilité se manifeste entre les deux partenaires dont le passé physiologique est différent. La pointe de racine a été isolée très tôt de la graine en germination tandis que le point végétatif de la plumule est resté en contact avec la plantule, bénéficiant des substances diverses fournies par les cotylédons.

Il convenait de compléter ces expériences par des greffes entre deux organes cultivés chacun séparément, à l'état embryonnaire.

Les méristèmes radiculaires de *Pisum* (sorte Mai-königin) se sont développés dans le milieu liquide de BONNER avec vitamine B₁. Les embryons, séparés très tôt des cotylédons, ont été cultivés sur un milieu gélosé de la composition suivante:

Eau	1000 cm ³	tartrate de fer	10 mg
Glucose	10 g	MnSO ₄	3 mg
Ca(NO ₃) ₂ . . .	500 mg	ZnSO ₄	0,5 mg
KNO ₃	125 mg	CuSO ₄	0,025 mg
MgSO ₄	125 mg	H ₃ BO ₃	0,5 mg
KH ₂ PO ₄ . . .	125 mg	mout de bière	50 g
		gélose	12 g

La partie apicale de l'embryon, faiblement développé sur milieu synthétique, est sectionnée après une durée de culture de 10 à 24 jours, coupée en biseau et insérée dans la fente d'un méristème radiculaire âgé de 3 à 8 jours. Le tout, maintenu à l'aide d'un fil de laine, est placé sur un milieu gélosé durant 2 à 4 semaines.

On remarque que la soudure s'effectue. La plantule reconstituée est ensuite placée en terre et cultivée en serre dans des conditions optimales. Elle se développe harmonieusement et 9 greffes sur 10 ont réussi.

Le tableau indique la longueur en cm de la partie feuillée de quelques plantules.

Jours*	Grefte n°					
	1	2	3	5	8	9
0	3,5	3	4	3	2	2
8	7	5	7	6	3	3
15	15	10	12	11	5	5,5
21	22	16	18	18	—	—
28	23	13	—	—	—	—

* Comptés à partir du transfert en pot de la plantule sur milieu synthétique gélosé.

Les plantes 1 et 2 produisent chacune une fleur normale après 25 et 23 jours. Les feuilles et les vrilles sont bien développées. Le fruit se forme régulièrement.

Il est donc possible d'effectuer avec succès une greffe entre les points végétatifs radiculaires et apicaux après qu'ils aient été cultivés en milieu synthétique. La plante ainsi reconstituée ne se distingue pas d'une plante normale. Les corrélations physiologiques normales ont été rétablies.



A gauche: greffe fortement grossie; au milieu: plantule reconstituée en terre, de 30 jours; à droite: plantule identique sortie de terre et montrant le développement du système racinaire.

La mise au point de cette technique permet d'envisager de nombreuses expériences de morphogenèse expérimentale.

R. LOUIS et W. H. SCHOPFER

Institut et jardin botaniques de l'Université de Berne,
le 28 janvier 1955.

Summary

Experimental grafting of embryonal apical buds of *Pisum* upon *in vitro* cultivated rootmeristems in agar culture is described.

After transferring in the soil the plants develop normally, form flowers and seeds.

Versuche zur somatischen Beeinflussung
der Organbildung pflanzlicher Embryonen

Bekanntlich kann man an tierischen Keimen durch stoffliche Einflüsse in der sensiblen Phase Vervielfachung oder Ablast von Organanlagen erzielen; eine grosse Anzahl von Arbeiten berichtet über Erfolge auf diesem Gebiet¹. Dagegen fehlen systematische Untersuchungen zur somatischen Beeinflussung der Organbildung pflanzlicher Embryonen meines Wissens fast ganz.

Einige Autoren, denen es gelungen ist, sehr junge Embryonalstadien höherer Pflanzen zu isolieren und *in vitro* weiterzuzüchten, beschreiben das Auftreten von Keimblattverwachsungen (Syncotylie) oder Keimblattvermehrungen (Pleiotcotylie) bei derart ihrem natürlichen Milieu entzogenen Keimen, so OVERBEEK und Mitarbeiter² bei *Datura* und RIJVEN³ bei *Capsella Bursa pastoris*.

Vermutlich beruhen solche nicht genetisch, sondern erst im Verlauf der Embryoentwicklung somatisch induzierten Hypo- und Hypermorphosen auf einer durch das künstliche Milieu bedingten «physiologischen Disharmonie»⁴. Es wäre zu untersuchen, ob hierbei allein physikalisch-chemische Verhältnisse verantwortlich zu machen sind oder ob die den Nährlösungen zugefügten aktiven Substanzen (Vitamine, Wuchsstoffe usw.) einen direkten oder indirekten spezifischen Einfluss ausüben.

Dass extreme (im positiven oder negativen Sinn) Ernährungsbedingungen modifizierend in die Vorgänge

¹ Vgl. F. E. LEHMANN, *Einführung in die physiologische Embryologie* (Birkhäuser, Basel 1945).

² J. VAN OVERBEEK, M. E. CONKLIN und A. F. BLAKESLEE, *Amer. J. Bot.* 29, 472 (1942).

³ A. H. G. C. RIJVEN, *Act. Bot. Neerland.* 1, 157 (1952).

⁴ Vgl. C. W. WARDLOW, *Proc. VIIIth int. Bot. Congr.*, Paris 1954.

¹ W. H. SCHOPFER et R. LOUIS, *Exper.* 8, 388 (1952).

der Organbildung am Embryo eingreifen können, ist bekannt. So beobachteten SAUNDERS¹ bei *Matthiola incana* eine Erhöhung des Prozentsatzes an Syncotylen in unter besonders günstigen Bedingungen gereiften Samen, LITOVCHENKO² bei der Zuckerrübe die meisten Tricotylen in den grössten Fruchtknäueln, STRAUB³ bei *Petunia* eine Förderung der Tricotylie durch Nahrungsmangel und HASKELL⁴ bei der Tomate eine Häufung der pleiocotylen Keime in den obersten und untersten Fruchtbündeln.

Man weiss aber auch, dass bei der Einwirkung von Wuchsstoffen auf Vegetationspunkte häufig «Teilungen» oder «Verwachsungen» der Blattanlagen resultieren. Dass dergleichen unter besonderen Bedingungen auch für die Cotyledonen gilt, haben EGGLE, MCILRAHT und Mitarbeiter⁵ gezeigt: mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) oder mit Maleinhydrazid behandelte Baumwollpflanzen lieferten Samen, deren Embryonen neben anderen Anomalien alle Grade von Syncotylie aufwiesen.

Selbstverständlich können, ebenso wie bei den oben erwähnten Embryokulturen, Abweichungen der Keimblattanlegung nur an den frühesten Embryonalstadien erzielt werden. Wuchsstoffbehandlung reifer Samen ist daher im allgemeinen in dieser Beziehung erfolglos⁶. So haben GAVAUDAN, DEBRAUX und Mitarbeiter⁷ Samen zahlreicher Dicotylenarten jeweils 48 h verschiedenen Wuchsstofflösungen ausgesetzt und nur bei einer Gartenvarietät von *Campanula* eine ein- oder beidseitige Vereinigung der Keimblattbasen (Gamocotylie) und bei *Nicotiana Tabacum* und *Petunia hybrida* eine Verwachsung der Keimblätter mit den ersten Laubblättern beobachtet. Wie die Verfasser ausdrücklich betonen, war es auch in diesen Fällen nur möglich, das interkalare Wachstum, nicht aber die Anlegung der Cotyledonen zu modifizieren, was allein durch die Behandlung «au moment de la formation des graines» zu erreichen sei.

Unter den Frühlingsblüheren unseres Klimas gibt es einige Arten (zum Beispiel *Eranthis hiemalis*, *Anemone narcissiflora*, *A. apennina*, *Ranunculus Ficaria* und die einkieblättrigen *Corydalis*-arten), bei denen die Samen bereits verbreitet werden, also äusserlich reif erscheinen, obwohl die Embryonen noch völlig undifferenziert sind⁸. Man kann diese daher sehr viel leichter der Einwirkung von Lösungen aussetzen als die gleich weit entwickelten Keime noch im Fruchtknoten befindlicher Samenanlagen.

Die ersten Versuche habe ich mit *Eranthis hiemalis* durchgeführt, über deren normale Embryogenese und Keimlingsanatomie eine frühere Arbeit berichtet⁹. Neuerdings wurden auch die «monocotylen Dicotylen» *Corydalis cava* und *Ranunculus Ficaria* einbezogen. Neben der Applikation verschiedener als wachstumsaktiv bekannter Stoffe wurden sowohl Temperaturschockbehandlungen als auch Röntgenbestrahlungen¹⁰

durchgeführt. Die Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen. Da sie aber bereits einige Ergebnisse gezeigt haben, die von allgemeinem Interesse sein dürften, soll im folgenden eine Übersicht über die wichtigsten Resultate des Jahres 1953 und über einige Stichprobenzählungen der zur Zeit laufenden Experimente gegeben werden.

Kontrollen. *Eranthis hiemalis* gehört mit einer Reihe anderer Ranunculaceen zu den Arten mit einem normalerweise bereits relativ hohen Prozentsatz spontan auftretender Keimblattanomalien. Von 3200 unbehandelten Samen waren 2899 (91%) gekeimt, darunter waren 7 tricotyle (0,24%), 1 tetracotyle (0,03%), 2 syncotyle (0,07%) Keimlinge und 1 Zwillingsspaar (0,03%), also insgesamt 11 Anomalien (0,37%).

1. Versuchsserie. Am 2. Mai 1953 wurden je 500 Samen von *E. hiemalis* jeweils 12 h in 50 cm³ der 2,4-D-Lösungen (1000 ppm und 100 ppm¹) gebadet und zu je 100 Stück in Blumentöpfe ausgesät (Tabelle I).

Tabelle I

Konzentrationen 2,4-D-Lösung ppm	Gekeimte Samen	Anomale Sämlinge	Von den anomalen Sämlingen waren:				
			Syn- cotyl	Tri- cotyl	Tetra- cotyl	Mehr als te- tracot.	Zwil- linge
1000	466	10 (2%)	2	6	1	—	1
100	461	3 (0,7%)	1	2	—	—	—

Ein zwölfstündiges Eintauchen in die Lösungen genügte also schon, um eine, wenn auch nur geringfügige Erhöhung des Prozentsatzes an Anomalien zu bewirken. Der Effekt lässt sich, wie der folgende Versuch beweist, durch eine intensivere Einwirkung gleicher Konzentrationen beträchtlich steigern.

2. Versuchsserie. Am 3. Mai 1953 wurden 1000 *Eranthis*-Samen zu je 200 Stück in 5 Töpfe ausgesät. Die Töpfe 1 bis 4 wurden am gleichen Tag mit je 200 cm³ der 2,4-D-Lösungen (1000, 500, 100 und 50 ppm) begossen, der Topf 5 bekam am 15. Mai, also 12 Tage später, die gleiche Menge einer 500-ppm-Lösung (Tabelle II).

Das Begiessen *frisch geernteter* Samen mit einer 0,1%igen 2,4-D-Lösung bewirkte also bei einer Überlebensrate von 78% fast 100% Keimblattanomalien (gegenüber 0,37% bei den Kontrollen). Mit abnehmender Konzentration der Lösungen wurde die Anzahl der Abweichungen geringer. Auch die etwa 2 Wochen nach der Samenreife¹ vorgenommene Behandlung hatte einen stark herabgeminderten Effekt (22% Anomalien gegenüber 65% bei der ersten Behandlung mit gleicher Konzentration).

Auffallend und unerwartet war das starke Überwiegen der Syncotylen gegenüber den Pleiocotylen bei der späteren Applikation. Auch bei den sofort nach der Ernte durchgeführten Versuchen konnte man den Eindruck haben, als verschöbe sich das Verhältnis zwischen Syn- und Pleiocotylen mit abnehmender Konzentration der

¹ E. R. SAUNDERS, Bibl. Genet. 4, 141 (1928).

² A. G. LITOVCHENKO, C. r. Acad. Sci. USSR. 27, 816 (1940), zitiert nach G. HASKELL, Phytomorph. 4, 140 (1954).

³ J. STRAUB, Z. Vererbgl. 82, 331 (1948).

⁴ G. HASKELL, Nature 173, 311 (1954).

⁵ W. J. MC ILRAHT, D. R. EGGLE und A. A. DUNLAP, Bot. Gaz. 112, 511 (1951). – D. R. EGGLE und W. J. MC ILRAHT, Bot. Gaz. 114, 114 (1952).

⁶ M. HANF, Nbl. dtsch. Pflanzenschutzd. 2, H. 6 (1950).

⁷ P. GAVAUDAN, G. DEBRAUX und A. BONNENFANT, C. r. Trav. Lab. Biol. Vég. Fac. Sci. Poitiers Nr. 4 (1953).

⁸ Vgl. M. FINDEIS, Sitzber. Akad. Wiss. Math.-Nat. Kl. 126, Abt. I, 77 (1917).

⁹ B. HACCUS, Planta (Berlin) 41, 439 (1953).

¹⁰ Damit die Röntgenbestrahlungen vorgenommen werden konnten, habe ich diesen Teil der Untersuchungen in Zusammenarbeit mit

Frau Dr. E. REINHOLZ (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) durchgeführt. Eine erste Mitteilung wurde bereits veröffentlicht: B. HACCUS und E. REINHOLZ, Naturwissenschaften 40, 533 (1953). Die genauere Auswertung der Ergebnisse wird durch REINHOLZ publiziert werden. REINHOLZ hat inzwischen die Bestrahlungsversuche an einem anderen Objekt (*Arabidopsis thaliana*) fortgeführt und die gleichen Effekte erzielt. (Exper. 10, 486 (1954)).

¹ Es wurde das NH₄-Salz der 2,4-D verwandt, ppm = 1:1000000.

Tabelle II

Behandlungszeit	Konz. 2,4-D-Lösung ppm	Gekeimte Samen	Anomale Sämlinge	Von den anomalen Sämlingen waren:				
				Syncotyl	Tricotyl	Tetracotyl	Mehr als tetracot.	Zwillinge
3. Mai 1953	1000	155	149 (96%)	4	39	41	63	2
	500	174	113 (65%)	18	52	24	19	—
	100	179	41 (23%)	19	22	—	—	—
	50	196	3 (1,5%)	—	3	—	—	—
15. Mai 1953	500	174	38 (22%)	33	5	—	—	—

Lösungen zugunsten der Syncotylen. Bei Konzentrationen von 50 ppm und darunter wurden allerdings keine Syncotylen, aber stets noch eine über dem Durchschnitt der Kontrollen liegende Anzahl von Tricotylen gefunden.

3. Versuchsserie. Die Versuche wurden, zum Teil etwas abgewandelt, im Frühjahr 1954 wiederholt. Da diese Pflanzen erst im Frühjahr 1955 keimen werden, wurden, um bereits ein vorläufiges Ergebnis zu bekommen, im August des laufenden Jahres Samenproben entnommen und die Embryonen präpariert. Die Stichproben bestätigten die im Vorjahr gewonnenen Befunde. Eine Behandlung frisch geernteter Samen (am 6. Mai 1954) hat im Konzentrationsbereich zwischen 100 und 1500 ppm 2,4-D zu einer signifikanten und mit der Konzentration zunehmenden Steigerung der Keimblattanomalien geführt an im übrigen durchaus lebenskräftigen Keimen. Bei einer Einwirkung von höher konzentrierter Lösungen überwiegt die Zahl stark unterentwickelter oder völlig verkrüppelter Embryonen.

Am 12. Mai, also 10 Tage nach der Samenreife, war noch ein Effekt zu erzielen, während die später (am 18. und 24. Mai) behandelten Embryonen überwiegend normal gestaltet, wenn auch zum Teil in ihrer Entwicklung gegenüber den Kontrollen zurückgeblieben waren. Die sensible Periode für den morphogenetischen Einfluss der 2,4-D endet also bei *Eranthis* etwa mit der zweiten auf die Samenreife (= eben beginnende Öffnung der Balgfrüchte) folgenden Woche. Da die Samen nicht alle genau gleichzeitig reifen, kann man die sensible Phase des einzelnen Embryos noch kürzer veranschlagen.

Bezüglich der relativen Zunahme der Syncotylen im Verhältnis zu den Pleiocotylen sowohl bei Anwendung schwächerer Konzentrationen als auch bei einer erst am Ende der sensiblen Periode erfolgten Behandlung entsprechen die vorläufigen Ergebnisse dieses Jahres denen des vorigen.

4. Versuchsserie. Nachdem sich die 2,4-D bei *Eranthis* in der Auslösung von Keimblattanomalien derart wirksam erwiesen hatte, lag es nahe, auch andere als wachstumsaktiv bekannte Substanzen zu prüfen. Die Behandlung erfolgte am 7. Mai 1954, und zwar mit 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T), mit 2-Methyl-4-Chlorphenoxyessigsäure, α -Naphthylessigsäure, β -Indolylessigsäure, Trijodbenzoesäure und Isopropyl-N-Phenylcarbammat unter Anwendung der bei der 2,4-D als wirksam erkannten Konzentrationen. Das Ergebnis der Stichproben kann wie folgt zusammengefasst werden. Eine nur sehr geringe Wirkung hatte die β -Indolylessig-

¹ Der Ausdruck wird hier im Sinne der «Verbreitungsreife» gebraucht.

Tabelle III

Art der Temperaturbehandlung	Gekeimte Samen	Anomale Sämlinge	Von den anomalen Sämlingen waren:		
			Syncotyl	Tricotyl	Tetracotyl
Ständig 28° . . .	242	24 (10%)	15	9	—
10 h 5°/26 h 28° .	252	24 (9,5%)	18	6	—
4 h 5°/20 h 28° .	261	28 (10,7%)	26	2	—
15 h 5°/15 h 28° .	243	12 (5%)	10	1	1
26 h 5°/10 h 28° .	216	7 (3,2%)	2	5	—
20 h 5°/4 h 28° .	287	4 (1,4%)	—	4	—
Ständig 5° . . .	298	4 (1,3%)	1	3	—

säure: unter 80 präparierten Embryonen waren nur 3 syncotyle und 2 tricotyle. Die Trijodbenzoesäure zeigte eine ebenfalls nur schwache Wirksamkeit im Konzentrationsbereich von 200 bis 500 ppm: unter 100 Keimen waren 1 syncotyl und 3 tricotyle. Alle übrigen Stoffe (auch das Isopropyl-N-phenylcarbammat!) zeigten qualitativ und quantitativ keinen geringeren bzw. einen noch stärkeren (2,4,5-T) Effekt als die 2,4-D.

5. Versuchsserie. Die Temperaturschockbehandlung wurde am 12. Mai 1953, also, wie sich später herausstellte, erst am Ende der sensiblen Periode begonnen. Trotzdem konnte eine gewisse, durch früheren Versuchsbeginn sicher noch zu steigernde Wirkung erzielt werden. Je 300 Samen wurden 2 Wochen lang in der in Tabelle III angegebenen Weise abwechselnd Temperaturen von 5° und 28° ausgesetzt.

Wärme wirkt anscheinend stärker schädigend, das heisst die Ausbildung von Anomalien begünstigend, als Kälte, denn der Anteil an abnormen Keimen hat ungefähr parallel mit der Dauer der applizierten 28°-Periode abgenommen. In weiteren Versuchen ist geplant, Temperatureinwirkung und Wuchsstoffbehandlung zu kombinieren.

Die morphogenetische Wirkung der Röntgenstrahlen entspricht im Dosisbereich von 2000 r bis 4000 r derjenigen von 0,1 bis 0,2%igen 2,4-D-Lösungen. Die dabei auftretenden Abweichungen in der Gestaltung der Embryonen und Keimpflanzen gleichen morphologisch und anatomisch in jeder Beziehung den durch Wuchsstoffe induzierten Morphosen.

Durch beide Behandlungsweisen entstanden eigenartige embryonale Regenerate, die bei Applikation von Temperaturschock und bei den schwächeren Wuchsstoffkonzentrationen nicht auftraten. Der Embryo, der zur Zeit der Samenreife das sogenannte birnförmige Stadium (Länge ohne Suspensor etwa 0,17–0,18 mm) erreicht hat, entwickelt sich in diesen Fällen nicht weiter, sondern bildet an seinem apikalen Ende oder etwas seitlich davon regenerativ ein oder zwei neue Embryonen, die zu fertigen, oft stark deformierten Keimen auswachsen. Die meisten, wenn nicht alle hochgradig pleiocotylen Sämlinge (5 und mehr Keimblätter) und die Zwillingbildungen der Wuchsstoff- und Röntgenbehandlungen sind derartige Regeneratkeime¹. Bei den künftigen Zählungen wird es daher nötig sein, die am ursprünglichen Embryo induzierten Keimblattanomalien, die qualitativ den normalen Variabilitätsbereich nicht überschreiten, von den viel weitergehenden Verände-

¹ Vielleicht haben die von REINHOLZ (Anm.¹⁰, S.150) als «unregelmässig tricotyl» bezeichneten Arabidopsis-Embryonen, die gehäuft an mit hohen Dosen bestrahlten Pflanzen auftraten, eine ähnliche Bildungsweise.

rungen an regenerativ gebildeten Keimen zu unterscheiden.

Sicher beruht auch die Verschiebung des Verhältnisses zwischen Syncotylen und Pleiocotylen zugunsten der Syncotylen bei den mit schwächer konzentrierten Lösungen oder zu einem späteren Zeitpunkt behandelten Embryonen, wenigstens zum Teil, auf dem Wegfall der nur durch intensivere Einwirkungen zustandekommenden, hochgradig pleiocotylen Regeneratembryonen.

B. HACCUS

Aus dem Botanischen Institut der Universität Mainz, den 3. August 1954.

Summary

Experiments on influencing cotyledon formation in embryos of *Eranthis hiemalis* are reported. By treating the seeds with 100–2000 ppm solutions of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid and even isopropyl N-phenyl carbamate one can obtain significant increases in twinning and in cotyledon anomalies (syncotyly and pleiocotyly of all degrees). Embryos can be successfully treated until approximately 2 weeks after initial opening of the follicles. X-radiations achieve the same effect, with doses of 2000–4000 r corresponding to the treatments with 1000–2000 ppm 2,4-D-solutions. By using weaker concentrations and with sudden temperature changes one can likewise raise the percentage of syn-, tri- and tetracotyly, but pleiocotyly of the higher degrees (5 and more cotyledons) appear only when more intensive methods of treatment are employed. These forms which exceed the normal range of variability arise as bud-like embryo regenerates on the as yet undifferentiated original embryo.

Bordure superficielle de pseudopodes au niveau des cellules mésothéliales du revêtement péritonéal chez les mammifères

L'étude au microscope optique du revêtement péritonéal des Mammifères montre que, souvent, la limite extérieure des cellules mésothéliales est marquée par une ligne particulièrement épaisse, quelquefois même par un mince plateau.

Au cours de recherches expérimentales sur l'absorption de la silice injectée dans le péritoine chez le Rat, nous avons pu étudier au microscope électronique les caractères de ce revêtement mésothélial.

Il supporte de fins pseudopodes grêles, larges d'environ 400 à 450 Å, longs de 0,6 à 0,8 μ . Ils sont peu serrés, avec des espacements allant de 0,1 à 0,3 μ . Le contenu de ces pseudopodes apparaît homogène, non limité par une membrane perceptible.

Les pseudopodes ne sont pas disposés en couche régulière, mais par touffes, avec un certain fusionnement à leur base. Ils se distinguent par là des éléments constituant les bordures en brosse du rein.

Ils ressemblent par contre aux fins pseudopodes décrits à la surface de certaines cellules: cellules endothéliales¹, cellules alvéolaires du poumon², cellules épithéliales de la trachée entre les cils vibratiles³.

¹ W. BERNHARDT, Communication au Congrès international d'Hématologie, Paris, 1954 (sous presse).

² A. POLICARD, A. COLLET et L. GILTAIRE-RALYTE, C. r. Acad. Sci. 239, 573 (1954).

³ G. BLOOM et H. ENGSTRÖM, Ann. Otol. Rhin. Laryng. 62, 15 (1953).

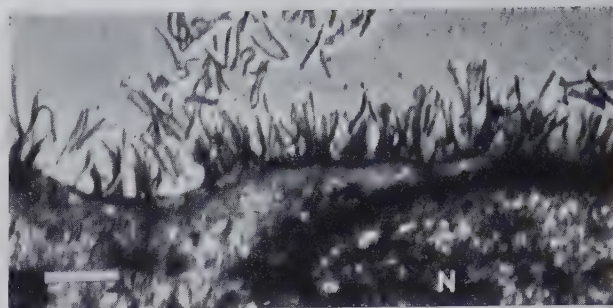


Fig. 1. Disposition des pseudopodes à la surface de la cellule mésothéliale. N partie supérieure du noyau. Grossissement: 12000.

Il semble plausible de rattacher ces formations aux processus d'absorption très développés au niveau du revêtement péritonéal.

A. POLICARD, A. COLLET et
L. GILTAIRE-RALYTE

Centre d'études et recherches des charbonnages de France, Paris et Verneuil, Oise, le 6 décembre 1954.

Summary

The surface of the mesothelial peritoneal cells (Rat) show with electron microscope very thin pseudopods, 0.6–0.8 μ by 0.04–0.045 μ , separated by 0.1–0.3 μ spacings, and different from vibratile cilia, but similar to the submicroscopic pseudopods of alveolar or endothelial cells.

Mitotic Frequency in Normal and Regenerating Tail Tips of *Rana pipiens* Embryos¹

The tail tip of the Amphibian embryo or larva has proved to be a most convenient material for chromosome studies, and has been used extensively for this purpose first by FANKHAUSER², later by COSTELLO and HENLEY³, and others. Usually these studies are done on whole mounts of tail tips, which of necessity are amputated, at the earliest, during later embryonic stages when the fin becomes thin and transparent. Recently, however, it has been shown that squash techniques also give good results when applied to tail tips (TING⁴). This means that it is possible to get satisfactory preparations of tail tips at any stage of development, and poses the problem of selecting the stage (s) which will give the largest number of mitotic figures for study. Primarily in order to solve this practical problem we have measured mitotic frequencies in smears of tail tips taken from normal frog embryos at stages ranging from SHUMWAY⁵ stage 18 (4 mm embryo) to stage 25 + (young tadpole). A comparable series of measurements was done on tail tips which were regenerating following amputation at stage 18 or stage 19.

Materials and Methods.—Fertilized eggs were produced in the laboratory according to the usual technique

¹ Aided by an Institutional Grant from the American Cancer Society.

² G. FANKHAUSER, Proc. Amer. Phil. Soc. 79, 715 (1938); Quart. Rev. Biol. 20, 20 (1945).

³ D. P. COSTELLO and C. HENLEY, Proc. Amer. Phil. Soc. 93, 428 (1949). — C. HENLEY and D. P. COSTELLO, J. Morph. 89, 91 (1951).

⁴ H. P. TING, Stain Techn. 25, 127 (1950).

⁵ W. SHUMWAY, Anat. Rec. 78, 139 (1940).

(RUGH¹) and were kept throughout development in spring water at 18–20°C. At stages 18 and 19 some of the embryos were set aside for tail amputation and regeneration. They were anaesthetized by exposure to M.S. 222 (ca. 0.037 %) for 2–3 min; i.e. just long enough to produce immobilization². Approximately three-fourths of the tail was cut off, after which the embryos developed normally and within 2 to 3 days regenerated normal tails.

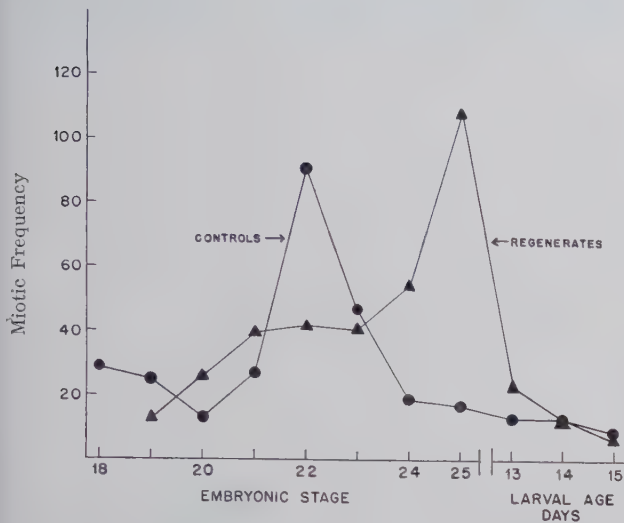


Fig. 1.—Mitotic frequency represents the mean number of mitoses per 1,000 cells.

Tail tip squashes were prepared at daily intervals starting at stage 18 for the normal (nonregenerating) series, and at stage 19 or 20 for the regenerates. The tips, approximately 3 mm in length, were first fixed for 15 min in Carnoy's fluid and were then transferred to acetic-orcein (LACOUR³) for 2 h. (Our stain was prepared by refluxing a 2 % solution of orcein in 60 % acetic acid for 1 h. The solution was filtered after cooling to room temperature.) Following the staining period the tips were squashed, stored in the alcohol vapor bath overnight, and finally mounted in diaphane. The mounting was done without removing the coverslip, simply by applying diaphane to 3 edges of the coverslip. As the alcohol evaporated the diaphane was drawn under the coverslip, giving a permanent mount.

In order to determine mitotic frequencies the squashes were observed at a magnification of about 660 diameters, the field under observation being delimited by means of

an ocular grid. Within this field we counted (a) the number of mitotic nuclei (nuclei in mitotic phases ranging from mid-prophase to telophase), and (b) the total number of nuclei. This was repeated on a series of fields in a given preparation until a total of 1000 nuclei had been counted.

Results and Discussion.—The results of our determinations of mitotic frequencies are summarized in the Table and the Figure. They show that in the case of the normal (nonregenerating) tail tip the mitotic frequency is at first low, then rises to a sharp peak at stage 22, and subsequently sinks again to a low level. When the tail is amputated at stage 18 the result is quite different. The mitotic frequency of the regenerate increases slowly during stages 19 to 24, displaying a plateau at stages 21 to 23. Then at stage 25 mitotic frequency increases suddenly, and subsequently is reduced again to a low level. Amputation at stage 19 also results in a plateau at stages 21 to 23 and displaces the frequency peak from stage 22 to stage 25 (see Table).

Stage	Age (days)	Number of mitoses per 1000 cells		
		Normal (non-regenerating) <i>N</i> = 5	Regenerates (amputation at stage 18) <i>N</i> = 8	Regenerates (amputation at stage 19) <i>N</i> = 2
18	4	29 (21–35)		
19	5	25 (15–32)	13 (10–17)	
20	6	13 (8–23)	26 (17–36)	23 (21–24)
21	7	27 (19–37)	40 (32–45)	42 (40–44)
22	9–	91 (84–101)	42 (33–49)	43 (42–44)
23	9+	47 (41–55)	41 (35–47)	52 (50–54)
24	10	19 (14–20)	55 (51–59)	63 (62–63)
25	12	17 (13–20)	109 (95–120)	78 (77–78)
25+	13	13 (12–15)	23 (21–25)	69 (68–70)
25+	14	13 (9–16)	13 (9–18)	44 (41–46)
25+	15	9 (8–10)	7 (5–11); <i>N</i> = 7	25 (23–26)

The *italic* values give the mean number of mitoses per 1,000 cells; the values in parentheses give the range. *N* = number of tail tips upon which each mean is based.

Another experiment, not included in the Table, gave the same type of result as that described in the preceding paragraph. In this experiment tail tips of approximately uniform size were squashed at all stages from 18 to 25 (normal embryos, 3 to 5 per stage); and from 19 or 20 to 25 (regenerates, 2 to 4 per stage). In each squash we counted all the mitoses, but did not count the total number of nuclei. In the case of the normal embryos the mean number of mitoses per squash increased from 1 at stage 18 to 123 at stage 22, and then decreased to 26 at stage 25. In the regenerates the number of mitoses increased gradually from 1 at stage 19 to 43 at stage 24, with a plateau at stages 21 to 23. Then at stage 25 the number of mitoses increased suddenly to 134. Thus, in this experiment as well as in the one previously described we find for the normal embryos a distinct peak in number of mitoses at stage 22, and for the regenerates a displacement of this peak to stage 25.

We should now consider briefly the question of how to account for these changes in mitotic frequency. The most obvious factors that might affect mitotic activity are (a) the development of the tail fin circulation, and (b) changes in the yolk supply. At first sight it seems reasonable to attribute the mitotic frequency peak found in normal embryos at stage 22 to the fact that tail fin circulation is established at this time, and the subsequent decline in mitotic activity to the diminution in the

¹ R. RUGH, *Experimental Embryology* (Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn., 1948), p. 102.

² Although the embryos were exposed to M.S. 222 for only a very brief period, and developed normally thereafter, it is still necessary to consider the possibility of there being effects of the chemical on mitosis. According to D. P. COSTELLO and C. HENLEY [Proc. Amer. Phil. Soc. 93, 428 (1949)], M.S. 222 used as an anaesthetic in a concentration of 1:2000 (0.05%) has no noticeable effect on mitosis in regenerating tail tips of *Triturus torosus* larvae. Also, in this laboratory the anaesthetic has been used on young tadpoles without detectable effect on the mitotic mechanism during subsequent regeneration. Finally, it may be noted from data presented in this paper that the mitotic frequency peak in regenerating tips occurs at stage 25, whether the anaesthesia and amputation occurred at stage 18 or at stage 19. If there were a significant inhibiting effect of the chemical on mitosis one would expect embryos exposed to it at stage 19 to exhibit the peak at a later stage than those exposed at stage 18. Considering these points, we think it unlikely that the M.S. 222, as used in these experiments, has significant effects on mitosis.

³ L. LACOUR, *Stain Techn.* 16, 169 (1941).

yolk supply during the later embryonic stages. However, observations which we have made on tail tip whole mounts indicate (a) that the tail tip circulation is established in both the normal and the regenerating tail at about the same time (stage 22); and (b) that the subsequent rate of utilization of yolk is also about the same in the normal and regenerating tail tips. Thus, if these factors are affecting mitotic activity in the normal tail, the effects are easily superseded by other and unknown influences which are operating in the course of regeneration in such a way as to eliminate the mitotic peak at stage 22 and to stimulate mitotic activity considerably later on, at stage 25.

Acknowledgement.—The author wishes to thank Dr. ROBERT W. BRIGGS for his guidance throughout the course of this investigation.

MARIE DiBERARDINO

Institute for Cancer Research and the Lankenau Hospital Research Institute, Philadelphia 11, Pa., November 19, 1954.

Résumé

L'auteur détermine la fréquence mitotique au cours du développement normal et de la régénération caudale chez *Rana pipiens*. Les observations s'étendent du stade 18 (embryon de 4 mm) au stade 25 (jeune têtard). Les numérations sont faites sur des préparations par écrasement de l'extrémité de la queue.

Développement normal: la fréquence est tout d'abord basse (18–21) puis atteint son maximum au stade 22 et s'abaisse ensuite jusqu'à un faible niveau (23–25).

Régénération: si la queue a été amputée au stade 18, la fréquence mitotique augmente lentement du stade 19 au stade 24, la courbe étant horizontale du stade 21 au stade 23. Au stade 25, la fréquence augmente subitement et retombe ensuite. L'amputation au stade 19 déplace aussi la fréquence maximum du stade 22 au stade 25.

Die Regeneration heteroplastischer chimärer Extremitäten bei *Triturus vulgaris* und *Triturus cristatus*¹

Zur Klärung der Frage nach der Herkunft und den Potenzen des Blastematerials bei der Extremitätenregeneration der Urodelen wurden heteroplastische chimäische Extremitäten zwischen *Tr. vulgaris* und *Tr. cristatus* hergestellt und später durch Amputation Regeneration ausgelöst (Abb. 1).

Dazu erfolgte im frühen Schwanzknospenstadium (Harr. 27, 28) ein Austausch ganzer Extremitätenanlagen zwischen den beiden Arten². Zu diesem Zeitpunkt ist das Ganglienleistenmaterial noch nicht in die Extremitätenanlage eingewandert. Man erhält also Extremitäten, deren mesodermaler und ektodermaler Anteil von der Spenderart stammen, deren Corium einschliesslich Pigmentzellen jedoch aus dem Wirt eingewandert ist³. Form und Grösse dieser Extremitäten sind spenderartgemäss, die Ausbildung des Pigmentmusters während der Meta-

morphose aber erfolgt wirtsgemäss. *Cristatus*-Extremitäten auf *Tr. vulgaris* färben sich wie der Wirt bräunlichgelb und besitzen wie dieser nur wenige schwarze Pigmentflecken. In den *vulgaris*-Extremitäten auf *Tr. cristatus* bildet sich ihrem Träger entsprechend eine dichte Schicht schwarzen Pigmentes (Abb. 2). Aus dem Regenerationsverlauf solcher Extremitäten ist deutlich ersichtlich, welchen Anteil die beiden artverschiedenen Komponenten im Stumpf der alten Extremität am Aufbau des Regenerates haben, und zu welchen Leistungen sie befähigt sind.

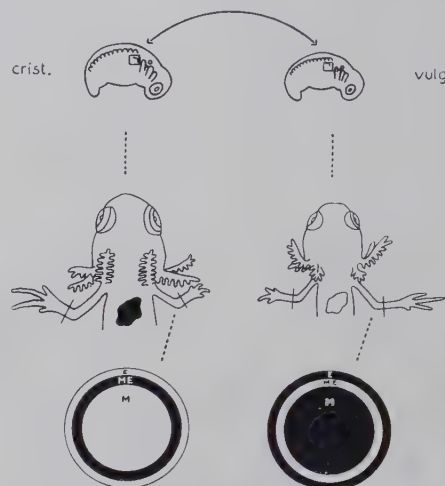


Abb. 1. Schematische Darstellung der beiden Operationsphasen und des Aufbaus der chimäischen Extremitäten vor und nach der Regeneration (E = Ektoderm, ME = Mesektoderm, M = Mesoderm).

Durch Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass der Regenerationsvorgang in der Larvenzeit bei beiden Arten morphologisch der embryonalen Extremitätenentwicklung¹ entspricht. Die durch heteroplastische Transplantation entstandenen Extremitäten verhalten sich hinsichtlich Regenerationsgeschwindigkeit, Form und Grösse ebenso. Die auf *Tr. vulgaris* regenerierende *cristatus*-Extremität durchläuft alle Regenerationsstadien in der für ihre Art typischen Weise. Im Vergleich zu der als Kontrolle regenerierenden *vulgaris*-Extremität auf der anderen Seite erfolgt die Blastembildung später, die Wachstumsrate der jungen Regenerationsknospe ist relativ geringer, und die Gliederung des Autopodiums setzt zeitlich später ein. Das chimäische Regenerat wird aber der Herkunft seines Materials gemäss grösser als die *vulgaris*-Kontrolle. Charakteristisch ist bei den *cristatus*-Regeneraten die frühzeitige starke Streckung des ersten und zweiten Fingers und ein noch schnelleres Wachstum des dritten Fingers unmittelbar nach seinem Erscheinen. Umgekehrt verläuft die Regeneration der *vulgaris*-Extremitäten auf *Tr. cristatus* schneller als die der *cristatus*-Kontrollen. Auch jene lassen, obwohl sie von der kleineren Art stammen, keinerlei Wirtseinfluss erkennen; sich schneller entwickelnd, durchlaufen sie die ihrer Art entsprechenden Stadien. Im fertigen Zustand gleichen sie völlig nicht-verpflanzten, normalen *vulgaris*-Extremitäten.

Dadurch ist nachgewiesen, dass ein Extremitätenregenerat aus Material des Extremitätenstumpfes gebildet wird, und dass die genetische Qualität des Blastematerials Regenerationsgeschwindigkeit und Ausgestaltung der Neubildung bestimmen. Die wirtsgemässe

¹ Die vorliegenden Untersuchungen sind auf Anregung von E. ROTMANN begonnen worden und wurden nach dessen Tod im September 1950 unter der Förderung von O. KUHN weitergeführt.

² E. ROTMANN, *Die Rolle des Ektoderms und Mesoderms bei der Formbildung der Kiemen und Extremitäten von Triton*, I. Operationen im Gastrulastadium. Roux' Arch. 124, 747 (1931); II. Operationen im Gastrula- und Schwanzknospenstadium, Roux' Arch. 129, 85 (1933). – V. C. TWITTY and J. L. SCHWIND, J. exper. Zool. 59, 61 (1931).

³ CHR. P. RAVEN, Roux' Arch. 134, 122 (1936).

¹ S. GLÜCKSOHN, Roux' Arch. 125, 341 (1932).



Abb. 2. *Tr. vulgaris* (links) mit chimärischer *cristatus*-Extremität und *Tr. cristatus* (rechts) mit chimärischer *vulgaris*-Extremität nach der Metamorphose (vor der Amputation).

Innervierung der chimärischen Regenerate ist morphologisch ohne Einfluss. Die artfremden Nerven werden vielmehr dazu veranlasst, der Strukturbildung des Transplantates zu folgen, um ihre Erfolgsorgane zu erreichen.

Das Verhalten der mesektodermalen Elemente bei der Regeneration der Extremitäten tritt besonders eindrucksvoll bei den metamorphosierten Versuchstieren hervor. (Die Pigmentunterschiede bei den Larven von *Tr. vulgaris* und *Tr. cristatus* sind nicht gross genug, um

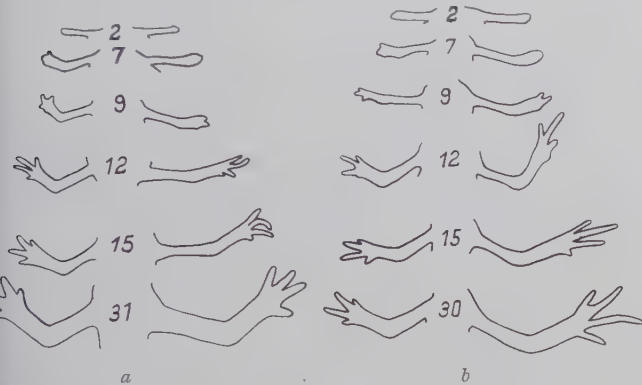


Abb. 3. Verlauf der Vorderextremitätenregeneration von zwei larvalen Chimären. a Vorderextremitätenregenerate einer *Tr. vulgaris*-Larve mit *cristatus*-Chimäre (rechts); (die Larve war am 31. Tage schon in die Metamorphose eingetreten). b Vorderextremitätenregenerate einer *Tr. cristatus*-Larve mit *vulgaris*-Chimäre (links). (Zahlen = Tage nach der Amputation.)



sichere Aussagen machen zu können.) Die wirtsgemäss pigmentierten Spenderextremitäten (siehe Abb. 2) regenerieren bezüglich Form und Grösse spenderartgemäss, bezüglich ihrer Pigmentierung aber wirtsgemäss (Abb. 4). Die mesektodermalen Elemente des Regenerates stammen also zweifellos von denen des Stumpfes ab, da Stumpfmesoderm und Stumpfektoderm der Chimäre ja einer anderen Art angehören. Die Annahme der Entstehung eines Regenerates aus einem einheitlichen Blastem (mit der Potenz zur Bildung aller Organteile), zu dem die verschiedenen Gewebe des Stumpfes mehr oder weniger viele Zellen beisteuern, ist also nicht zutreffend. Sonst wären einmal die Wirtselemente aus dem Corium durch die Gestalt des Regenerates nachzuweisen, zum andern hätte sich Spendermaterial, das über ein Blastem in den mesektodermalen Bereich des Regenerates gelangt wäre, durch dessen Ausfärbung verraten müssen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht also hervor, dass den mesektodermalen Elementen eines Extremitätenregenerates ein mesektodermales Blastem zukommt, aus dem sich nur mesektodermale Organteile bilden.

H. J. ANTON

Zoologisches Institut der Universität Köln, den 22. Juni 1954.

Résumé

Au stade «bourgeon de queue» (HARRISON, 27, 28), les ébauches des extrémités antérieures de *Tr. vulgaris* et de *Tr. cristatus* sont échangées et greffées hétéroplastiquement. Ces greffons se développent et donnent des membres dont la forme et les dimensions sont conformes à leur origine. Après section de ces pattes, chez la larve, le type donneur se manifeste au cours de la régénération, dans la vitesse de celle-ci, dans la taille et la conformation des extrémités régénérées. Par contre, les cellules de la crête ganglionnaire de l'hôte (méséctoderme) pénètrent dans le greffon et assurent à celui-ci le type de pigmentation de l'hôte, ce type étant maintenu lors d'une régénération ultérieure. L'action du système nerveux de l'hôte n'exerce aucune action morphogénétique. Il est donc manifeste que le régénérat n'est pas un massif cellulaire homogène mais qu'il provient de deux catégories d'éléments juxtaposés, les cellules de chacune d'entre elles évoluant selon ses potentialités génétiques propres; le méséctoderme, en particulier, ne donne que des formations méséctodermiques.



Abb. 4a. *Tr. cristatus* mit chimärischer *vulgaris*-Extremität (links) und (b) *Tr. vulgaris* mit chimärischer *cristatus*-Extremität (links) nach der Regeneration. Form und Grösse der Regenerate der Chimären sind spenderartgemäss, die Pigmentierung ist wirtsgemäss.

Use of the Isolated Heart of a Freshwater Mussel (*Anodonta cygnea* L.) for Biological Estimation of 5-hydroxytryptamine¹

It has been shown that 5-hydroxytryptamine (serotonin)² has a strong stimulatory influence on the heart of many mollusc species (ERSPAMER and GHIRETTI³, WELSH⁴). The isolated heart of certain marine forms (*Venus mercenaria*, *Buccinum*) has been made use of for bioassay of this substance (TWAROG and PAGE⁵, WELSH⁶).

In order to find out whether the heart of the common freshwater mussel, *Anodonta cygnea*, could be of value as a test organ for identification and estimation of 5-hydroxytryptamine and similar substances, the reaction of the *Anodonta* heart to 5-hydroxytryptamine and some other substances has been studied. The experiments were performed on isolated ventricles containing a short piece of intestine. They were suspended in a bath (volume 10 ml) which was aerated. In accordance with PILGRIM⁷, a mixture of distilled water and sea water (salinity 30‰) in the proportions 96:4 was used as the environmental fluid⁸. The *Anodonta* ventricle preparations, either immediately or after an initial standstill of varying duration, began to beat with a slow even rhythm. Generally the isolated ventricles would continue beating for more than 48 h.

It was observed that 5-hydroxytryptamine, even in rather low concentrations, causes a marked increase in amplitude and frequency of isolated *Anodonta* ventricle. The threshold concentration seemed to be about 10⁻⁹ gm/ml. The inotropic response took place immediately after addition of the drug and could always be repeated with 5–8 min intervals and change of suspension fluid. Graded responses were obtained with concentrations up to about 10⁻⁶ gm/ml.

Positive inotropic effects were also seen after dihydroergotamine (conc. 10⁻⁵), cocaine (conc. 10⁻⁴), vasopressin and oxytocin, but the amplitude increase in these cases was slower and less reversible than after 5-hydroxytryptamine.

Adrenaline and noradrenaline in high concentrations (10⁻⁴ gm/ml) have a slightly negative inotropic effect, but weaker doses seemed to be without any effect. After tyramine, dopamine, substance P, histamine or acetylcholine in varying concentrations, no distinct reactions were seen. However, TEN CATE and REESINCK⁹ have observed an inhibitory effect from acetylcholine in high concentration.

Because the *Anodonta* ventricle is highly sensitive to 5-hydroxytryptamine, but relatively insensitive to a lot of other physiologically active substances, this preparation ought to be well suited for the biological estimation of 5-hydroxytryptamine.

¹ Aided by a grant from the Kungl. Fysiogr. Sällsk., Lund.

² Serotonin creatinine sulfate was provided by Abbott Laboratories, Chicago.

³ V. ERSPAMER and F. GHIRETTI, J. Physiol. 115, 470 (1951).

⁴ J. H. WELSH, Arch. exper. Path. Pharmacol. 219, 23 (1953); Nature 173, 955 (1954).

⁵ B. M. TWAROG and I. H. PAGE, Amer. J. Physiol. 175, 157 (1953).

⁶ J. H. WELSH, Nature 173, 955 (1954).

⁷ R. L. C. PILGRIM, J. Exper. Biol. 30, 297 (1953).

⁸ According to PILGRIM the mixture ought to be buffered by M/400-NaHCO₃.

⁹ J. TEN CATE and M. J. REESINCK, Physiol. Comp. Oecolog. 3, 337 (1954).

A more detailed account of the present studies will be published later.

R. FÄNGE

Department of Zoophysiology, University of Lund, September 25, 1954.

Zusammenfassung

Die rhythmischen Kontraktionen des isolierten Herzventrikels von *Anodonta* werden von 5-Hydroxy-Tryptamin niedriger Konzentration beschleunigt und verstärkt. Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Acetylcholin, Tyramin usw. wesentlich höherer Konzentrationen haben keine oder nur geringe Wirkungen. Das *Anodonta*-Herz-Präparat scheint deshalb für den biologischen Nachweis von 5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin, Enteramin) geeignet.

Propagation of a Virus of the Encephalomyocarditis Group in Roller Tube Cultures of Mouse Testicular Tissue

The encephalomyocarditis group of viruses is composed of immunologically related viruses of Columbia-SK, MM, Mengo encephalomyelitis, and encephalomyocarditis. These viruses have been shown, from an analysis of their known physical and biological properties, to be different strains of a single virus¹. The recent work of VERLINDE *et al.*², suggests the possibility that a significant relationship between this group of viruses and poliomyelitis may occur in nature. This report deals with the propagation of MM virus in roller tube cultures of mouse testicular tissue.

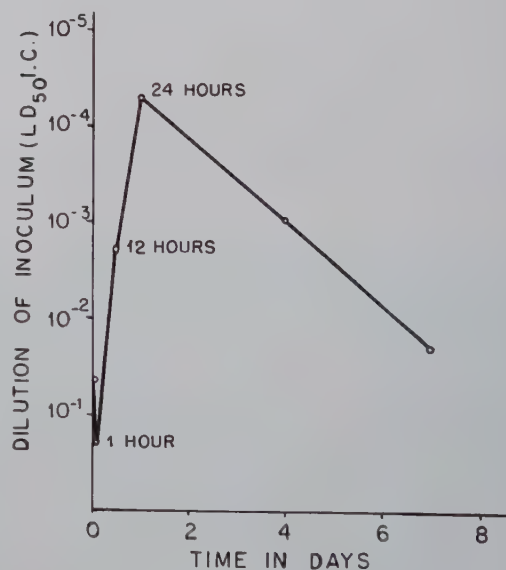


Fig. 1.—Growth pattern of MM virus in roller tube cultures of mouse testicular tissue in lactalbumin hydrolysate medium. Inoculum LD₅₀ of 0.03 ml of 10^{-1.6}, I.C. Mouse titrations of virus in fluids harvested from infected tissue cultures at 1 hour, 12 hours, 24 hours, 4 days, and 7 days.

¹ J. WARREN, J. E. SMADEL, and S. B. RUSS, J. Immunol. 62, 387 (1949). — G. W. A. DICK, J. Immunol. 62, 375 (1949).

² J. D. VERLINDE and J. H. MOLRON, Antonie Van Leeuwenhoek 20, 129 (1954).

The strain of virus used was obtained from Dr. WERNER HENLE of the Children's Hospital, Philadelphia, and has had 15 mouse intracerebral passages in this laboratory. Roller tube cultures were prepared with minced testes from 5-12-week old Swiss white mice freshly killed with ether, by following essentially the methods of CARREL¹ and GEY². Two types of culture media were employed: (a) 0.5% lactalbumin hydrolysate and (b) a medium consisting of 10% chick embryo juice (1:1 minced chick embryo and buffered HANKS' solution), 10% inactivated horse serum, 20% bovine serum ultrafiltrate, and 60% buffered HANKS' solution. To each were added 100 units penicillin and 100 µg streptomycin per milliliter medium. The cultures were incubated on roller machine (15 revolutions per hour) at 37°C, and confirmed to show good growth of fibroblasts before inoculation with virus.

An initial set of 3 culture tubes, designated T-1, was inoculated with 0.1 ml of 10⁻⁵ dilution of 10% brain emulsion from mice typically infected with MM virus by an intracerebral route. After 4 days fluids from the tubes were pooled and 0.1 ml of 10⁻¹ of this fluid was inoculated into each tube of a second set of the cultures. Successive transmissions in this manner were carried out through the 10th tissue passage (T-10). Amount of virus in each inoculum was determined by intracerebral inoculation of 0.03 ml of ten-fold serial dilutions of the virus-containing fluid into 3-week old Swiss white mice. The 50% lethal doses were calculated by the method of REED and MUENCH³. At the 11th tissue culture passage, the growth pattern of the virus was investigated (Fig.1). Samples of fluid in the virus-infected tissue cultures were taken out at 1 h, 12 h, 24 h, 4 days, and 7 days respectively after virus inoculation, and titrated into Swiss white mice for viral activities. All Infected cultures were checked daily for characteristic cytonecrosis⁴ by a microscope with 3×, 10×, and 43×, objectives, and a 10× eye piece.

As control, similar examinations were made with uninfected tissue cultures. All fluids harvested were confirmed to contain no bacteria by culturing on tryptone-soybean-yeast extract agar slants for 7 days at 37°C.

In order to ensure that MM virus was actually transferred but not another virus' neutralization tests with immune rabbit serum were performed.

In this study a calculated final dilution of 4.89 × 10⁻²⁶ of the original infected mouse brain was obtained at T-11. Virus containing fluid from the eleventh serial tissue passage was capable of initiating infection in Swiss white mice to give characteristic symptoms of paralysis and death and an LD₅₀ of 10⁻⁴⁻⁶. The maximum degeneration of infected fibroblasts was at 5 days after virus infection. All mice inoculated with fluids from uninfected cultures (control cultures) survived.

The findings in this study compare favorably with the results obtained by SMITH and EVANS⁴ in their study on the propagation of MM virus in monkey testicular tissue in roller tube cultures, but seem better than the results obtained by CHAMBERS *et al.*⁵, who used flask cultures with mouse testicular tissue. Because of the easiness of

getting the material as well as the capacity to support viral propagation as evidenced above, the roller tube culture method of mouse testicular tissue is very useful for the study of MM virus. These findings emphasize moreover that this neurotropic virus propagates readily in extraneural tissue.

Acknowledgement: The author wishes to express his sincere gratitude to Dr. C. A. EVANS for his advice, guidance and encouragement and to other members of the Virus Research Laboratory of the Department of Microbiology of the University of Washington School of Medicine for their suggestions and invaluable aid.

A. FABIYI¹

Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle 5, Washington, September 24, 1954.

Zusammenfassung

11 Passagen von MM-Virus der EMC-Gruppe in Mäusetestikel-Gewebekultur werden beschrieben. Maximale Virustiter von etwa 10⁻⁴ wurden erreicht; maximale Degeneration der infizierten Fibroblastenkulturen wurde nach 5 Tagen Inkubation beobachtet.

¹ Present address: Department of Microbiology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pa., U.S.A.

The Prevention of Experimentally Induced Reticulo-Sarcoma by Hypothyroidism

The injection of trypan blue into rats promotes a high incidence of reticulo-sarcoma involving the liver¹, lymph nodes², kidneys and other organs³. In a large group of animals some 15 to 18% failed to respond to trypan blue. The reason for this refractoriness has been the subject of our enquiry.

Hypothyroidism⁴ as well as inanition⁵ can retard the emergence of hepatocellular carcinoma in rats fed butter yellow and can also prevent the development of pituitary tumours in rats in response to chronic oestrogen stimulation⁶. We have also demonstrated that severe malnutrition can almost completely suppress the reticulosis induced by trypan blue, an observation which offers a possible explanation for the decreased incidence of human reticulosis in France reported by CAZAL⁷ during World War II. In view of the fact that inanition depresses basal metabolism, the possibility thus presented itself that hypothyroidism would also prevent the emergence of the reticulo-sarcoma induced by trypan blue.

Experimental. 121 adult rats weighing between 250 and 300 g were injected subcutaneously at fortnightly intervals with 1 cm³ of 1% of an aqueous solution of trypan blue (Grubler). Twenty of these rats were fed

¹ R. C. PARKER, *Methods of tissue culture*, 2nd ed. (P. B. Hocker Inc., New York, 1950).
² G. O. GEY, *Amer. J. Cancer* 17, 752 (1933). – G. O. GEY and M. K. GEY, *Amer. J. Cancer* 27, 45 (1936).
³ L. J. REED, and H. MUENCH, *Amer. J. Hyg.* 27, 493 (1938).
⁴ W. M. SMITH and C. A. EVANS, *J. Immunol.* 72, 353 (1954).
⁵ V. C. CHAMBERS, W. M. SMITH, and C. A. EVANS, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76, 213 (1951).

¹ J. GILLMAN, T. GILLMAN, and C. GILBERT, *S. Afr. J. Med. Sci.* 14, 21 (1949).
² J. GILLMAN and T. GILLMAN, *Clinical Proceedings* 8, 222 (1949); *Cancer* 5, 792 (1952).
³ J. GILLMAN, T. GILLMAN, and C. GILBERT, *La Semaine des Hôpitaux de Paris* 27, 1 (1951).
⁴ K. E. PASCHKIS, A. CANTAROW, and J. STASNEY, *Cancer Research* 8, 257 (1948). – P. N. HARRIS and G. H. A. CLOWES, *Cancer Research* 12, 471 (1952).
⁵ A. TANNENBAUM and M. SILVERSTONE, *Adv. Cancer Res.* 1, 452 (1953). Edited by J. P. GREENSTEIN and A. HADDOW, Academic Press.
⁶ J. GILLMAN, C. GILBERT, and I. SPENCE, *In press.*
⁷ P. CAZAL, *La réticolose histiomonocytaire* (Masson & Cie, Paris, 1946).

anti-thyroid drugs (thiourea) at a 0.5% level in the diet. The drug was fed first at a level of 0.01% and gradually increased to the 0.5% level. This latter procedure prevented the acute pulmonary oedema known to occur especially after feeding thiourea. The diet was otherwise the same for these experimental rats as for the control series. The remaining 101 rats, constituting the control series, were treated with trypan blue only and were not fed any of the antithyroid drugs. Since 3 of the rats fed thiourea and 5 of the control rats died before the 100th day of the experiment, only 17 of the experimental rats and 96 controls could be reported as the effective number to be used for comparison.

71 of 96 control rats, that is 76% developed reticulo-sarcoma whereas not a single experimental rat developed such a tumour. These results are statistically significant.

Examination of the livers of the trypan blue-treated rats fed antithyroid drugs revealed that whereas tumour formation was inhibited, only in one instance was the trypan blue reaction completely suppressed. In the remaining 16 livers, there was mild portal reticulosis, and the appearance of fluid-filled cysts, similar to those described previously¹. However, with one exception, the trypan blue response in the rats fed antithyroid drugs at the end of 200 to 400 days was not greater than that observed in control animals at the end of the 40th day of the experiment. In the exceptional instance, the reaction at the 140th day was comparable with that occurring in the control rats at about the 70th day of treatment.

From the foregoing, it can be concluded that a measure of thyroid activity is essential for the development of reticulo-sarcoma in response to trypan blue. Depression of thyroid function below a defined level, whether achieved by antithyroid drugs or by underfeeding, will not only depress the intensity of the reticulosis but indeed excludes the development of reticulo-sarcoma. Depression of the thyroid therefore retards and can even prevent the emergence of experimentally induced reticulo-sarcoma as well as carcinoma of the liver and of adenoma of the pituitary gland.

J. GILLMAN, CHRISTINE GILBERT,
and ISOBEL SPENCE

Departments of Physiology and Anatomy and Joint Nutrition Research Unit of the Council for Scientific and Industrial Research and the University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, December 1, 1954.

Zusammenfassung

Die Entstehung von Reticulosarkom bei Ratten nach mehrmaliger Injektion von Trypanblau kann unterdrückt werden durch Entkräftung, Verabreichung anti-thyreoidaler Mittel und durch alle andern Faktoren, welche den Stoffwechsel herabsetzen.

¹ J. GILLMAN, T. GILLMAN, and C. GILBERT, S. Afr. J. Med. Sci. 14, 21 (1949).

The „Feeding Centre” of the Hypothalamic Region of the Rat Brain

According to BROBECK *et al.*¹, the sense of hunger and the food intake is regulated through a “feeding centre”

localized in the lateral parts of the anterior hypothalamus. An attempt to analyse the biochemical mechanism of the regulation was made, applying the tracer technique. Groups of hungry (H) rats were administered 200 μ C Na₂HP³²O₄ intraperitoneally at the end of a 24 h hunger-period, together with fed (F) ones. They were sacrificed 15–60 min later through plunging in liquid oxygen. In other sets of experiments the isotope was given at the start of the hunger period and the animals were sacrificed at the end. Besides the feeding centre, C, two adjacent parts of the hypothalamus, denoted A and B, were prepared from the frozen brain tissue, likewise samples of cerebrum, blood, liver and muscles were taken for comparison of the gross distribution of activity in H and F animals.

Pooled brain samples of H and F rats were analyzed with regard to:

- the distribution of P³² per unit volume of the samples;
- the partition of P³² on the trichloroacetic acid (TCA) fraction, the lipid fraction and the combined protein + nucleic acid fraction;
- the partition of P³² within the TCA-fraction¹.

Determinations of total phosphorus in the A–C samples and of orthophosphate and the hydrolysable end-groups of ATP+creatine phosphate, as well as of total creatine² (free creatine+creatine phosphate) in the TCA fractions, were also performed.

The liver of H rats took up appreciably more ³²P than the liver of F animals, whereas the concentration in the muscles, the cerebrum and the blood was similar within experimental errors. This suggests that the distribution of ³²P through the blood to other parts of the brain than the hypothalamus does not differ in the two groups of animals (Table I).

The distribution of P³² on the hypothalamic samples under consideration shows a characteristic pattern (Table I) which may be described in the following way: while the C samples of H rats accumulate more activity than those of F rats, the opposite is true for samples A and B. This is simply demonstrated through the ratio's C/A and C/B which measures are statistically different in H and F rats. No significant differences occurred in the amount of total phosphorus which account for these changes. The same general mode of distribution was found when the samples were chemically fractionated according to (b) and the activity of the single fractions determined. The analyses thus suggest an all-over change in the biochemical activity of the samples of hungry rats as compared with fed ones.

It is of interest to note that the integrated activity in the three samples A + B + C, making up about 2/3 of the total hypothalamus, does not differ appreciably in the two groups of rats. This indicates that the P³² supply through the blood to the hypothalamic region as a whole is rather unimpaired by the state of hunger. Obviously, then, the partition of activity within the hypothalamus is autonomously regulated.

In further analyses, the concentration of the hydrolysable end-groups of ATP+creatine phosphate was found mainly to follow the same pattern of distribution as the P³² given in Table I, while the concentration of orthophosphate seems to vary less (Table II). Likewise the distribution of total creatine agreed with the general scheme. Calculations of the amount of activity present

¹ L. ERNSTER, R. ZETTERSTRÖM, and O. LINDBERG, Acta Chem. Scand. 4, 942 (1950).

² P. EGGLETON, S. R. ELSDEN, and N. GOUGH, Bioch. J. 37, 526 (1943). – A. H. ENNOR and H. ROSENBERG, Bioch. J. 51, 606 (1952).

¹ J. R. BROBECK, J. TEPPERMAN, and C. N. H. LONG, Yale J. Biol. Med. 15, 831 (1943). – B. K. ANNAND and J. R. BROBECK, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 77, 323 (1951).

Table I. – Resorption of P³² in the unfractionated samples A, B and C and incorporation of the isotope into their TCA, lipid and protein + nucleic acid (NA) fractions. Determination at 60 min and 24 h after injection of isotope. Activity measurements calculated as counts/min per mm³ of brain sample.

Fraction analyzed	Isotope time	Hungry					Fed					Significance test for the different hungry: fed			
		Counts/min/mm ³ of			Ratio of:		Counts/min/mm ³ of			Ratio of:		C/A		C/B	
		A	B	C	C/A	C/B	A	B	C	C/A	C/B	t		P	
Unfractionated sample	60 min	52.2	30.7	75.6	1.67	2.89	72.0	39.5	40.0	0.763	1.14	2.81	~ 0.01	3.88	< 0.001
	24 h	126	106	187	1.49	1.77	132	108	132	0.986	1.20	3.60	~ 0.001	3.79	~ 0.001
TCA	60 min	55.3	36.0	68.3	1.25	1.95	50.5	44.2	40.6	0.948	1.02	1.68	< 0.2	4.12	~ 0.005
Lipids		1.33	0.620	1.71	1.54	3.90	1.31	1.53	1.33	1.17	1.03	0.765	0.4-0.5	2.96	< 0.02
Proteins-NA's	24 h	4.69	3.22	6.09	1.32	2.07	3.64	3.77	3.63	1.19	1.10	0.608	0.5-0.6	2.33	< 0.05
TCA		81.4	62.5	76.7	0.954	1.23	87.0	63.4	50.0	0.558	0.790				
Lipids	24 h	20.9	18.2	28.4	1.28	1.61	24.5	18.9	21.2	0.884	1.12				
Proteins-NA's		14.5	12.8	17.5	1.22	1.38	14.7	12.8	13.2	0.903	0.947				

in the fractions also agreed in principle with the results given in Table I. Attempts to analyse creatine phosphate gave inconsistent results because of the small amounts present.

In particular the mode of partition of ATP and creatine between the various samples is interesting in view of the importance of these substances in the energy metabolism of the cell, NACHMANSOHN and MACHADO¹ have shown that homogenized brain tissue synthesizes acetylcholine (Ach) in the presence of ATP. An increase of Ach would be expected to cause local vasodilatation and consequently also an increase in the ³²P supply. Considering these findings, one would expect the variations found in the ATP and creatine concentration to regulate the supply of P³² to various parts of the hypothalamus. In experiments not recorded here, about

90% of the activity was still found to be present as ortho-P³² 30 min after the injection. The partition of ortho-P³² between the various samples thus agreed with the corresponding determinations given in Table II, while the variations in the total amount of orthophosphate were less pronounced. The uneven distribution of ortho-P³² will thus in turn account for the results found in the lipid and protein + nucleic acid fractions (Table II).

Although many details are not yet settled, it may be that the sense of hunger and the food intake is regulated through a mechanism where the reactions proposed by NACHMANSOHN play a predominant role. The analyses also indicate that biochemical differences do occur between closely adjacent volumes of brain tissue. This is in line with the notion of HIMWICH¹ that specialized parts of the brain are distinguished by a chemical activity of their own.—A full account of these biochemical investi-

¹ D. NACHMANSOHN, J. Cell. Comp. Physiol. 39, 137 (1952). — D. NACHMANSOHN and H. L. MACHADO, J. Neurophysiol. 6, 397 (1943).

¹ H. E. HIMWICH, *Brain Metabolism and Cerebral Disorders*, Will. and Wilk., Baltimore, 1951).

Table II. – Concentration of ortho-P and hydrolyzable end-groups of ATP and creatine phosphate (ATP-P + creatine-P) expressed as γ P $\times 10^{-2}$ per mm³ of tissue. Total creatine (free creatine + creatine phosphate) as substance per mm³. P³²-activity calculated on the total amount of each fraction present per mm³ of tissue. Mean values from determinations on 12 rats 24 h after the start of the hunger period and injection of P³².

State of animals	Samples analyzed	Fraction from TCA-extract	Concentration determinations				Activity determinations			
			γ	$\Sigma A + B + C$	C/A	C/B	counts/min	$\Sigma A + B + C$	C/A	C/B
Hungry	A	Ortho-P	52.7	151.5	0.93	0.97	25.1	73.1	1.08	1.32
	B		50.4				20.7			
	C		48.4				27.3			
Fed	A	Ortho-P	63.7	166.8	0.74	0.85	32.1	80.5	0.66	0.79
	B		56.4				27.1			
	C		46.7				21.3			
Hungry	A	ATP-P + creatine-P	11.4	30.5	1.24	3.36	0.451	1.35	1.30	1.93
	B		5.03				0.306			
	C		14.1				0.588			
Fed	A	ATP-P + creatine-P	5.84	28.8	1.42	0.56	0.392	2.27	0.97	0.25
	B		14.7				1.50			
	C		8.21				0.379			
Hungry	A	total creatine	1.45	4.96	1.31	1.19				
	B		1.60							
	C		1.91							
Fed	A	total creatine	1.52	4.28	0.85	0.88				
	B		1.47							
	C		1.29							

gations together with physiological ones has appeared elsewhere¹.

A. FORSSBERG and S. LARSSON

Institute of Radiophysics, Karolinska Sjukhuset and Department of Physiology, Kungl. Veterinärhögskolan, Stockholm, October 15, 1954.

Zusammenfassung

Die Analyse mit radioaktivem Phosphat zeigte, dass das «feeding centre» (BROBECK) im Hypothalamus von Ratten, die 24 h ohne Futter gehalten wurden, erheblich mehr P^{32} aufnahm als das gesättigte Tiere. Der Aktivitätsüberschuss war gleichmässig auf die säurelösliche, Lipoid- bzw. Protein + Nukleinsäure-Fraktion verteilt. Es wurde weiter gezeigt, dass ATP und Kreatin eine Konzentrationsverschiebung wie P^{32} aufweisen. Es wird angenommen, dass die ungleichförmige Verteilung von P^{32} eine Folge der ATP-Kreatin-Verschiebung im Hypothalamus ist.

¹ A. FORSSBERG and S. LARSSON, *Acta Physiol. Scand.* 32, Suppl. 115, Part II (1954).

The Uptake of Radioactive Phosphorus into Phosphorus Compounds in the Brains of Virus-Infected Mice¹

Since viruses can multiply only in living tissues, it is of great interest and importance to investigate the changes in infected tissues. The tracer-technique with radioactive isotopes has been proved to be a useful procedure for the minute detection of biological and chemical processes. Several reports have been presented on the distribution of radioactive phosphorus (P^{32}) in the brain tissue of normal or virus-infected animals². The purpose of this paper is to add some findings relative to the subject, which were obtained by the authors after conducting a preliminary experiment³.

Material and Methods

White mice weighing 6.5 ± 0.3 gm and the mouse-adapted Mochizuki-strain dengue virus⁴ were used. This virus has been able to proliferate regularly in mouse brain tissue. The mice were fed on wheat and green vegetable throughout the experiments.

From a number of mice inoculated with the virus intracerebrally, 6 groups of 4 or 5 mice each were picked at 4, 28, 52, 76, 100, 124 h, respectively, following the inoculation. Viral activity of the inoculum was adjusted so that no mice survived at 168 h after the inoculation. Each group was then injected intraperitoneally with a solution of P^{32} ⁵. The injected dosage per mouse was $0.02 \pm 10\%$ mc in 0.1 ml, at the time of administration.

¹ Aided by grants from the Japan Ministry of Education, and the Japanese Society for the Promotion of Science.

² A. J. SAMUELS, L. L. BOYARSKY, R. W. GERARD, B. LIBET, and M. BRUST, *Amer. J. Physiol.* 164, 1 (1951). – M. E. RAFELSON, jr., R. J. WINZLER, and H. E. PEARSON, *J. Biol. Chem.* 181, 583 (1949). – J. A. ANDERSON, C. GEMZELL, L. GEMZELL, V. S. BOLIN, and L. T. SAMUELS, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 690 (1950). – Department of Bacteriology, University of Utah College of Medicine, Personal communication. – H. A. DE LUCA, R. J. ROSSITER, and K. P. STRICKLAND, *Biochem. J.* 55, 193 (1953).

³ S. HOTTA, T. FUJII, and I. TANABE, *Virus* 2, 26 (1952), in Japanese.

⁴ S. HOTTA, *J. Infect. Dis.* 90, 1 (1952).

⁵ PO_4 in weak HCl; neutralized with NaOH and sterilized in an autoclave. The original lots were obtained from the U.S. Atomic Energy Commission through the medium of the Japan Scientific and Technical Administrative Commission.

24 h after each isotope-administration, the mice of each group were killed by cutting the throat. From each animal, blood was collected and the brain was removed. The materials, respectively, were pooled in each group. The blood was centrifuged at 3,000 r.p.m. for 15 min to separate the serum. Suitable precautions were taken to minimize the haemolysis. The brains were washed three times with chilled saline solution and wiped thoroughly with filter-papers, in order to eliminate the blood components as completely as possible.

Of the serum, the inorganic phosphorus fraction was separated by the method of DELORY¹. The brains were weighed, homogenized with a grinder, and subjected to the fractionations of phosphorus compounds contained into the total acid-soluble phosphorus (AS), phospholipid (LP), total protein-bound phosphorus (TP), desoxy-ribonucleic acid phosphorus (DNA), ribonucleic acid phosphorus (RNA), and residual inorganic phosphorus (RS) fractions, by the methods of SCHMIDT and THANNHAUSER², as well as of DELORY¹. A minor modification of the original method² was made so that the separation of acid-soluble fraction was performed not by the filtration but by the centrifugation, floating detritus, if any, being very slight.

Of each fraction thus obtained, a part was subjected to the total phosphorus determination by the method of ALLEN³ modified so that conc. sulphuric acid was used in place of perchloric acid for the digestion of organic substances. With the remainder, the radioactivity was measured as follows: After being decomposed in conc. sulphuric acid, the material was added with potassium phosphate, magnesium mixture and ammonium hydroxide. The precipitate thus formed was put into an aluminium-plated dish, washed with methanol, and, after being dried in a calcium chloride jar, was subjected to beta-ray counting with a mica-window Geiger-Mueller tube. For the details of these techniques, as well as for some theoretical aspects, refer to references⁴.

Of each fraction, then, "relative specific activity", i.e., the "specific activity" (counts per minutes per milligrams of total phosphorus) as per cent of that of the serum inorganic phosphorus fraction, was calculated.

As a control, the same analyses were conducted with the materials from mice injected intracerebrally with a normal mouse brain emulsion. As another control, the specific activity of serum inorganic phosphorus in the normal mice, which were given no intracerebral injection, was surveyed to examine the reliability of this index as the base of comparison. In addition, the virus-content of infected brains at the given time was titrated by the method of REED and MUENCH⁵.

Results

The virus-content of infected brains, as well as the symptoms of infected mice, are illustrated in Figure 1.

The Phosphorus amount of each fraction is tabulated in Tables I and II, including additional results on the dry weight of total protein-bound fraction (Table IIb).

¹ G. E. DELORY, *Biochem. J.* 32, 1161 (1938).

² G. SCHMIDT and S. J. THANNHAUSER, *J. Biol. Chem.* 161, 83 (1945).

³ R. J. L. ALLEN, *Biochem. J.* 34, 858 (1940).

⁴ G. HEVESY, *Radioactive Indicators* (Interscience Publishers, New York, 1948). – H. T. CLARKE *et al.* *The Use of Isotopes in Biology and Medicine* (Univ. of Wisconsin Press, Madison, 1949). – I. L. CHAIKOFF and D. B. ZILVERSMIT, *Adv. Biol. Med. Physics* 1, 321 (1948).

⁵ L. J. REED and H. MUENCH, *Amer. J. Hyg.* 27, 493 (1938).

Table I.—Serum inorganic phosphorus amount in mouse (mg/dl).

Samples*	Time after inoculation in hours	V	C
1	28	3.9	3.6
2	52	2.8	3.0
3	76	3.3	2.5
4	100	4.1	2.8
5	124	3.3	2.3
6	148	3.2	2.9

* The indications will be applied similarly in the following tables.
V: Virus-infected groups. C: Control groups.

The specific activity of serum inorganic phosphorus in the normal mice are shown in Table III, indicating a rather good stability. The relative specific activities of virus-infected, as well as control groups are presented in Table IV.

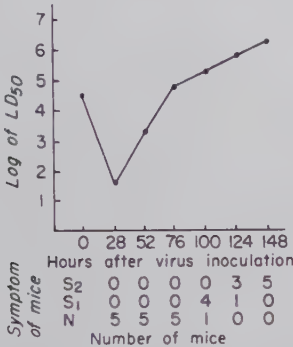


Fig. 1.—Virus-content of infected brain and symptom of infected mice. S2: Paralysis or severe tremor; S1: Debility or ruffled hair; N: Normal appearance.

From the figure and tables given above, it is indicated that: No significant differences were found in the total phosphorus amount of each fraction as specified here, as well as the dry weight of total protein-bound substances, between the virus-infected and control groups. During the stage of maximum virus multiplication, however, the uptake of radioactive phosphorus into phosphorus compounds increased significantly in the infected groups.

Discussion.—It has been reported that infections of neurotropic viruses stimulate the uptake of radioactive phosphorus into phosphorus compounds in the

Table II
(b) Dry weight of total protein-bound fraction in mouse brain (Percentages of original tissue).

Samples	V	C
1	10.6	10.5
2	10.9	10.5
3	10.2	10.2
4	11.2	12.3
5	11.5	11.7
6	10.6	10.8

infected brain tissue¹. The authors' studies with the mouse-adapted dengue virus also indicated that the radioactivity of the phosphorus compounds in brain tissue increased significantly during the stage of maximum virus multiplication, while no change could be detected in the total phosphorus amount. Although no conclusive evidence has yet been obtained by the present

Table III
Specific activity of serum inorganic phosphorus fraction in normal mice.

Samples*	Specific Activities**
A	100
B	152
C	87
D	99

* Each sample is a pool from 4 to 5 mice. ** Assuming that Sample-A is 100.

authors as to how the increase of isotopic uptake is brought about, the results may be correlated with a theory of HYDÉN², who, based on the ultra-violet microscopic experiments, reported that the nucleic acids are intimately involved in the process of viral multiplication.

¹ M. E. RAFELSON, JR., R. J. WINZLER, and H. E. PEARSON, J. Biol. Chem. 181, 583 (1949). — J. A. ANDERSON, C. GEMZELL, L. GEMZELL, V. S. BOLIN, and L. T. SAMUELS, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 690 (1950). — Department of Bacteriology, University of Utah College of Medicine, Personal communication.
² H. HYDÉN, Cold Spring Harbor Symposia 12, 104 (1947).

Table II.—(a) Phosphorus amount of mouse brain (mg per 100 g fresh tissue)

Samples	AS*		LP		TP		DNA		RNA		RS	
	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
1	82	91	173	179	79	76	20	20	26	27	6	8
2	104	79	178	193	64	70	16	17	23	19	10	7
3	83	100	166	187	79	80	19	19	22	20	10	8
4	87	85	190	182	71	75	20	21	21	23	6	9
5	93	90	181	193	73	84	18	22	19	25	9	7
6	89	92	172	168	69	77	16	23	20	24	5	8

* Abbreviations should be referred to the text.

Table IV.—Relative specific activity of phosphorus compounds in mouse brain.

Samples	AS		LP		TP		DNA		RNA		RS	
	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
1	71.7	75.7	8.4	11.9	10.0	13.9	2.2	1.8	17.1	18.9	13.4	14.8
2	65.2	74.2	11.5	10.5	12.8	13.6	1.4	2.4	18.6	15.4	14.5	16.5
3	57.1	45.3	12.3	8.3	9.9	11.9	2.5	1.9	16.3	14.8	11.2	13.9
4	60.6	54.4	10.6	9.8	9.0	9.2	3.2	1.7	14.6	19.4	9.7	9.8
5	175.1	47.5	19.2	10.2	21.4	9.5	4.3	2.0	44.4	12.9	28.4	11.0
6	140.0	65.8	20.5	9.1	20.7	12.4	4.4	2.5	38.5	17.5	25.4	13.7

The authors wish to express their gratitude to Dr. TATSUO KARIYONE, and Dr. TOMOJI SUZUKI, of Kyoto University, for valuable advice and suggestions. Their thanks are also due to scientists of the Department of Bacteriology, the University of Utah College of Medicine, U.S.A., for critical discussions.

R. KIMURA, S. HOTTA, T. FUJII¹,
I. TANABE, Y. HASHIMOTO,
T. INOUE, and T. FUJITA

From the Microbiological Institute and Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, October 2, 1954.

Zusammenfassung

Die Verteilung von radioaktivem Phosphor im Gehirn virusinfizierter weisser Mäuse ist geprüft worden. Im Zeitpunkt maximaler Virusvermehrung nimmt die Aufnahme des radioaktiven Phosphors in den Phosphorverbindungen der infizierten Gehirne deutlich zu. Virologische und biochemische Aspekte wurden diskutiert.

¹ Present address: Department of Medical Chemistry, Gifu Medical College, Gifu, Japan.

DISPUTANDUM

Possible Biosynthesis of D-lysergic Acid Diethylamide-like Compounds from Mescaline¹

There are some data in the literature suggesting that the intact mescaline molecule is not involved directly in the model psychosis elicited by its administration.

Any one of 500 mg mescaline, 1 mg D-lysergic acid ethylamid (LAE) or 100 μ D-lysergic acid diethylamide (LSD) causes experimental (model) psychosis of similar intensity and duration in healthy volunteers. This decreasing order of dosage was related recently to the increasing affinity for wool protein of the same compounds (0, 1.1, 2.6 $\times 10^{-2}$ mM per gram wool) indicating that high activity as well as high affinity for wool are concomitant characteristics². Since mescaline displays no affinity for wool, this might suggest that the intact molecule as such is not the active compound.

SCHUELER³ as well as BLOCK, BLOCK and PATZIG⁴, emphasize that the inhibition of rat brain respiration by 0.12% mescaline (substrate, glucose) as reported by QUASTEL and WHEATLEY⁵ in their WARBURG-experi-

ments is brought about after a 2–3 h (1) contact of the brain-homogenate with mescaline. Such a time lag points to the possible transformation of mescaline to an active compound¹.

BLOCK *et al.*² have shown that the metabolism of mescaline by the white mouse resembles that by man. Still, the peak of hallucinations in humans upon administration of mescaline and the presence of the highest amounts³ of radioactive labelled C¹⁴-mescaline in the brain of the white mouse do not coincide in time. This discordance might suggest the possibility of a transformation of the mescaline into the active compound.

Enzymatic incorporation of only 20–60 μ of C¹⁴-labelled mescaline (i.e. around 1% of the amount administered) into the liver protein⁴ of the white mouse as well as the peak of the phenomena of a model psychosis in humans on administration of mescaline coincide in time⁵; an observation not inconsistent with our hypothesis.

According to RICHTER⁶, 58% of the mescaline administered to human volunteers can be recovered unchanged in the urine after 18 h; small amounts of trimethoxyphenylacetic acid were also found. This result is not contradictory to our hypothesis and suggests that only part of the mescaline might be transformed into an active compound.

2,3,4-trimethoxyphenylethylamine (iso-mescaline) an isomer of the symmetrical 3,4,5-compound (mescaline), does not cause model psychosis in normal volunteers⁷ and was found to display no affinity for wool⁸; thus it behaved as an inactive compound like, for instance, mescaline itself⁹. It is also reported¹⁰, that none of the

¹ The 0.12% mescaline concentration used in QUASTEL's experiments is far above that which might occur in the organism [F. W. SCHUELER, J. Lab. Clin. Med. 33, 1297 (1948); W. BLOCK, K. BLOCK and B. PATZIG, Z. Physiol. Chem. 290, 160 (1952)], and it can be argued that smaller amounts would need either an even longer time lag or would not cause an inhibition at all.

² W. BLOCK, K. BLOCK, and B. PATZIG, Z. Physiol. Chem. 290, 230 (1952).

³ These "highest amounts" are, however, relatively very small quantities.

⁴ If the mescaline-protein complex itself might cause the model psychosis as postulated by B. PATZIG, Naturwissenschaften 40, 13 (1953), an immunity towards mescaline, or at least an anaphylactic shock might be expected to occur after readministration of the drug. According to our own observations, this is not the case.

⁵ B. PATZIG, Naturwissenschaften 40, 13 (1953).

⁶ D. RICHTER, Biochem. J. 32, 1763 (1938).

⁷ K. H. SLOTTA and J. MUELLER, Z. Physiol. Chem. 238, 14 (1936).

⁸ R. FISCHER, to be published.

⁹ R. FISCHER, Exper. 10, 435 (1954); J. Ment. Sci. 100, 623 (1954).

¹⁰ L. RETI and J. A. CASTRILLON, J. Amer. Chem. Soc. 73, 1767 (1951). — L. RETI, β -Phenethylamines; see R. H. F. MANSKE and H. L. HOLMES "The Alkaloids", Vol. 3, Chapter 22 (Academic Press, Inc. Publ., New York, 1953).

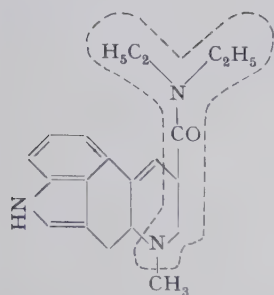
¹ Saskatchewan Committee on Schizophrenia Research. Supported by the Department of National Health and Welfare, Ottawa.

² R. FISCHER, Exper. 10, 435 (1954); J. Ment. Sci., 100, 623 (1954).

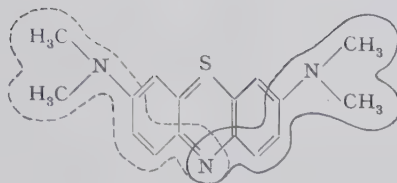
³ F. W. SCHUELER, J. Lab. Clin. Med. 33, 1297 (1948).

⁴ W. BLOCK, K. BLOCK, and B. PATZIG, Z. Physiol. Chem. 290, 160 (1952).

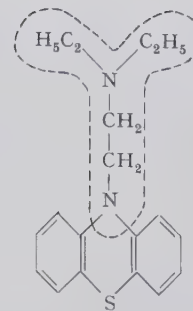
⁵ J. H. QUASTEL and A. H. WHEATLEY, Biochem. J. 27, 1603 (1933).



LSD



Methylene blue



"Diparcol"

N-substituted derivatives of mescaline cause model psychosis.

There is a similarity between the psychopathological phenomena caused by 500 mg mescaline and by 100 γ LSD¹, and 300 mg of mescaline or 90 γ or more of LSD cause an apparently similar alteration of the liver function in humans as measured by the glucuronic acid test².

Inhibition of an LSD-produced model psychosis may be brought about by previous administration of certain compounds of the phenothiazine series, e.g. methylene blue, β -diethylaminoethyl-N-phenothiazine ("Diparcol", Poulenc Ltd.) etc., displaying some apparently essential features of the LSD molecule³ (see dotted lines).

LSD⁴ has uterotonic properties; mescaline does not exhibit uterotonic action when added to the excised organ but only when administered *in situ*⁵. Thus, transformation of the mescaline molecule *in situ* is suggested to be a prerequisite for its activity.

The foregoing suggest that mescaline is transformed *in vivo* to a compound resembling LSD in its main structural features and also having an affinity for wool, and that the observed physiopathological and psychopathological properties of mescaline are due to this LSD-like compound. Whether the biosynthesis is brought about by small amounts of partially demethylated mescaline with a tyramine-like compound, or whether it results, e.g. through condensation of very small amounts of mescaline with *nor*-adrenalin (or 5-hydroxytryptamine⁶) both recently identified in the brain⁷, is still in the realm of speculation.

Block⁸ has shown that tyramine is the most powerful activator of the enzymatic incorporation of C¹⁴-mescaline in the mouse liver without affecting mescaline oxydase. This evidence suggests that the formation of small amounts of a compound derived from mescaline and similar in structure to LSD might occur in the liver and could be connected with the "etiology" of the model psychosis elicited in humans after the administration of mescaline.

Acknowledgment. The stimulating discussions with Professors J. PEPPER, C. McARTHUR, V. WOODFORD, University of Saskatchewan,

¹ R. FISCHER, F. GEORGI, and R. WEBER, Schweiz. med. Wschr. 81, 817 (1951).

² R. FISCHER, F. GEORGI, and R. WEBER, Schweiz. med. Wschr. 81, 817 (1951).

³ R. FISCHER and N. AGNEW, Naturwissenschaften 41, 431 (1954).

⁴ E. ROTHLIN, unpublished data (1939).

⁵ G. S. GRACE, J. Pharmacol. 50, 359 (1934).

⁶ The biogenesis of LSD in the fungus has recently been described, postulating that oxidized 5-hydroxytryptophan is a precursor [D. HARLEY-MASON, J. Chem. Ind. 1952, 172].

⁷ M. VOGT, Communication to the British Pharmacol. Soc., 5. Jan. 1952. – A. H. AMIN, T. B. B. CRAWFORD, and J. H. GADDUM, Communication to the British Pharmacol. Soc., 7. July 1952.

⁸ W. BLOCK, Z. Physiol. Chem. 294, 49 (1954)

Saskatoon, and Dr. M. KATES, National Research Laboratories Ottawa, are gratefully acknowledged.

R. FISCHER

Psychiatric Research Unit, Research Laboratory, Munroe Wing, General Hospital, Regina, Saskatchewan, Canada, August 5, 1954.

Zusammenfassung

Die Hypothese einer Biosynthese von D-Lysergsäure-diäthylamidähnlichen Substanzen aus Meskalin in der Leber und im Gehirn wird postuliert.

PRO LABORATORIO

A Scanning and Computing Microphotometer for Cell Analyses

The development of complicated technical tools in cytology automatically produces new technical problems. One of the main problems in quantitative cytology is the time it takes to obtain data from many measurements on each cell, and then to repeat them on many cells in order to get statistically significant results. Every problem on differentiation, cell growth or function involves this difficulty, when the sample is a section through a number of cells. There is little point trying to draw conclusions from observations on a few cells in such studies. The scanning and computing microphotometer described in this paper can be used for quantitative studies of cell sections, and is applicable for the various wave-length ranges now used in cytology. Our aim was to obtain information on transmission values integrated over the cytological preparation point by point with a sufficient resolution and within a short time. For the construction we have used the information theory in its most elementary form, applying a technique commonly used within this field: the pulse technique.

The principle is to convert light intensity to time. The apparatus is thus a type of information machine with a receptor, a microscope system and a scintillation tube with a scanning system, a computing unit, a memory unit, and a printing unit – the effector. 12,000 measurements are made on the sample under examination and the results are computed and recorded in numbers with retained spatial localization. The computation of the 12,000 values takes four minutes. The area of the sample covered by a single measurement is usually 3 μ^2 . An ultimate resolution of about 1 μ is possible, and the permissible error of the apparatus has been set to 1%.

Let us consider the general construction (Fig. 1). The unit at A contains the microscope system and the scanning mechanism. B is the computing unit with its con-

ning of one line is complete. A section of the steel band is seen to the left in the diagram, in front of the phototubes.

The electronic problem was to achieve a linear amplification of the *DC* from the phototube. This was solved in the following way. The *DC* generated in the phototube is modulated by an oscillator and the rectified amplitude is then proportional to the light intensity. The *AC* from the phototube is amplified and rectified and fed into a comparator together with a sawtooth voltage. When the sawtooth voltage has attained the value of the above-mentioned, amplified and rectified *AC* amplitude a synchronizing pulse is emitted. Thus, during the time needed for the sawtooth voltage to increase, a pulse train is emitted with a certain number of pulses proportional to the light intensity. This computation is a synchronised process governed by another phototube. At the moment when the $3 \mu^2$ area of the sample is to be measured, the sawtooth voltage is started. The values of the light intensities and the synchronizing pulses are stored in the heads of the memory.

When it is convenient, these values are printed as percent transmission point by point as they occur in the sample. One must be sure, however, that the transmission values never exceed 100%, and an initial control is therefore necessary. The apparatus has an advance control and an operation control. The advance control renders the transmittance visible on the dekatrone tubes of the panel. Individual values can also be computed. The operation control, seen to the right of the panel, is a continuous register of the localization and the number of measured values that have been registered.

The printing system consists of a pulse-counting device and an IBM writer. Trigger circuits ensure that the dekatrones emit their information in the right order.

Figure 3 shows an example of values obtained from a section through a spinal ganglion which has been exposed at 8–10 Å in an X-ray microspectrograph. The radiogram was then inserted in the computer and scanned. When the transmission values have been printed on the square of paper, the image of the preparation is projected over this area in the same scale and the outline of the cells are drawn. Details of this information machine will be published elsewhere.

S. BOURGHARDT, H. HYDÉN,
and B. NYQUIST

Department of Histology, Medical Faculty, University of Göteborg, December 17, 1954.

Zusammenfassung

Der vorliegende Artikel beschreibt einen Zellenanalysator, der die Lichttransmission in einem mikroskopischen Präparat absucht und quantitativ berechnet. Das Präparat, das in einem wahlfreien Teil des elektromagnetischen Spektrums untersucht werden kann, teilt sich in 12000 Messpunkte ein, gewöhnlich jedem $3 \mu^2$ im Präparat entsprechend. Die Transmissionswerte in Prozenten werden automatisch in der Ordnung, wie sie im Präparat vorkommen, ausgeschrieben, wobei sowohl die Verteilung als auch die Menge der untersuchten Substanz leicht aus dem Ziffernbild, das die Maschine gibt, berechnet werden kann. Die Berechnung der 12000 Messwerte dauert 4 min.

PRO EXPERIMENTIS

A Simple Paper Chromatographic Method for the Study of Serum Protein Patterns in Health and Disease¹

FRANKLIN and QUASTEL² applied paper chromatography to the separation of plasma proteins and showed that the patterns exhibited in chromatograms of pathological plasma vary greatly, according to the disease, indicating distinct changes from the normal. The chromatographic patterns obtained by FRANKLIN and QUASTEL were criticised and shown to be artefacts by HALL and WEWALKE³. Recently TAUBER and PETIT⁴ have described a two-dimensional paper chromatographic method for the separation of a portion of each fraction of albumin and γ -globulin from a mixture of the two. Complete separation of the proteins was not possible by this method.

A simple circular paper chromatographic method for the separation of serum proteins is described in this note in the hope that it may prove useful for clinical diagnosis and prognosis of diseases.

The procedure adopted for obtaining the chromatograms was similar to the one described by GIRI *et al.*⁵ for the separation of amino acids in blood. 40 μ l of the serum is spotted at the centre of a Whatman No. 1 filter paper (18.5 cm diameter). Immediately after spotting, the "wick" is inserted at the centre of the paper and the chromatogram is developed with about 40% of aqueous alcohol as the solvent. The spot should not be allowed to dry on the paper before development. After the solvent front reaches a distance of about 8 cm from the centre of the paper, it is dried at 90–100°C for about 5 min. The protein fractions are delineated as channelled and circular zones by staining with the dye bromophenol blue as follows:

- (1) Dipping for about 3 min in 0.2% bromphenol blue in saturated alcoholic HgCl_2 solution for staining and fixing the serum proteins on the paper;
- (2) Rinsing in 0.5% acetic acid solution;
- (3) Final washing in water to remove acetic acid and drying at 60–70°C.

Figure 1 is the typical pattern of normal serum.

For better comparison of the difference in the patterns showing the variation in Albumin-globulin ratio, it is convenient to run a mixed chromatogram which may be carried out by spotting 10 μ l of normal and pathological serum on the circumference of a circle (3 cm diameter) drawn at the centre of the paper, diametrically opposite to each other and developing the chromatogram as described above. Figure 3 is the chromatogram of the patterns of normal and liver cirrhosis sera. The difference in composition of the serum protein fractions-

¹ Presented before the symposium on "Chromatography" held on 3rd and 4th April 1953 under the auspices of the Society of Biological Chemists, India, and published in an abstract form in the Proceedings of the Society of Biological Chemists (India) 11, 33 (1953).

² A. E. FRANKLIN and J. H. QUASTEL, *Science* 110, 447 (1949); *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74, 803 (1950). – A. E. FRANKLIN, J. H. QUASTEL, and S. F. VAN STRATEN, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77, 783 (1951).

³ D. A. HALL and F. WEWALKE, *Nature*, 168, 685 (1951).

⁴ H. TAUBER and E. L. PETIT, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80, 143 (1952).

⁵ K. V. GIRI, K. KRISHNAMURTHY, and T. A. VENKITASUBRAMANIAM, *Lancet*, Sept. 20, 562 (1952).

albumin and globulin of the two samples of serum is clearly shown by the reduction in the length of channels relating to albumin zone (the outer zone) and enhancement of the intensity of the colour of the globulin zones (inner zones) in the case of liver cirrhosis (Fig. 2) and in

albumin and is characteristic of serum containing low concentration of this fraction, while the increase in the intensity of the colour of the globulin zones (inner zones) indicates the increase in globulin fractions as in the case of liver cirrhosis.

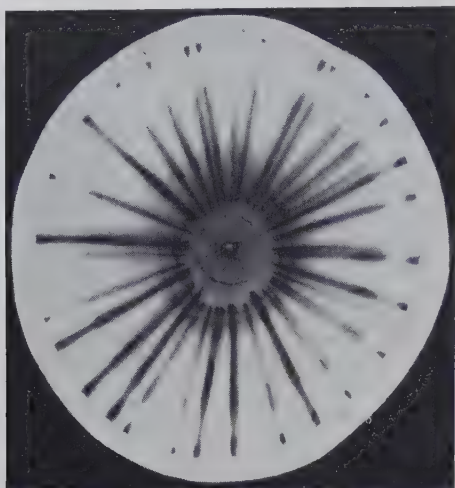


Fig. 1.—Circular paper chromatographic pattern of normal serum.

the case of normal serum the increase in the length of the channels, touching the solvent boundary showing thereby the increase in albumin fraction, compared to the pattern of the liver cirrhosis serum. The shortening of the channels of the albumin zone without reaching the solvent boundary line indicates low concentration of

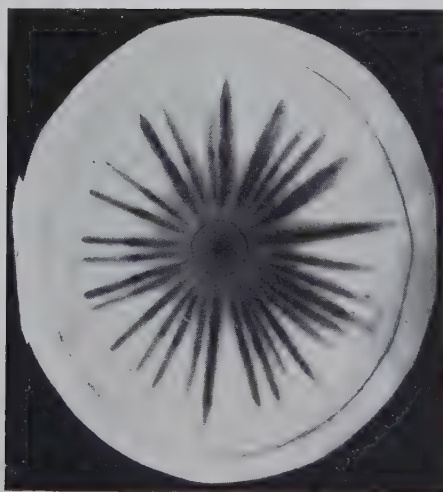


Fig. 2.—Circular paper chromatographic pattern of the serum of a patient with cirrhosis of liver.

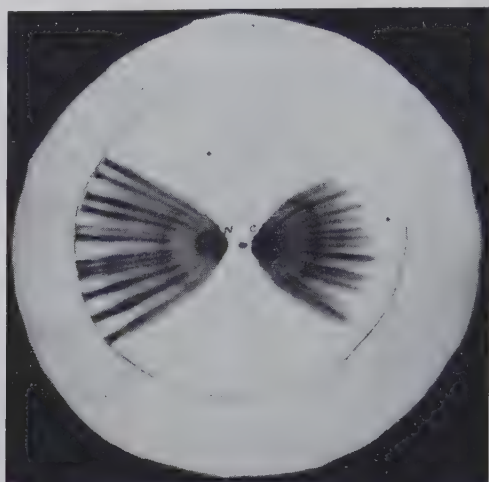


Fig. 3.—Circular paper chromatographic patterns of normal serum, and the serum of a patient with cirrhosis of liver.

Normal serum and the serum of liver cirrhosis patients show characteristic patterns in a number of cases investigated. The chromatographic experiments were always supplemented by the simultaneous determination of the electrophoretic pattern. The visual chromatographic patterns showing the variations in the albumin-globulin fraction is in agreement with the electrophoretic patterns obtained¹.

Acknowledgement. I wish to acknowledge the kind assistance of Dr. P. H. KRISHNA RAO, Medical Officer, Victoria Hospital, Bangalore, in providing me with blood samples from his patients and thank Mr. M. A. COHLY for carrying out the electrophoretic analysis of the samples in this laboratory.

K. V. GIRI

Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore 3 (India), April 24, 1954.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache Methode zur Trennung und Differenzierung der Serumproteine mit Hilfe der Papierchromatographie (Rundfilter-Papierchromatographie) beschrieben. Die Chromatogramme zeigen charakteristische Unterschiede der Albumin- und Globulinfraktionen bei normalen Seren und bei Seren von Patienten mit Leberzirrhose.

¹ By using the Swiss Micro-electrophoretic apparatus of the firm Messrs. Kern & Co.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIUM PROGRESSUS

Über das Hauptproblem
bei konvexen Rotationskörpern

Bekanntlich bildet man die Menge aller konvexen Körper mittels der Ausdrücke

$$x = \frac{4 \pi F}{M^2}; \quad y = \frac{48 \pi^2 V}{M^3}$$
 (1)

auf eine (x, y) -Ebene ab. Es entsteht das Problem, den Rand des Bildes aufzufinden¹.

Der direkte Lösungsweg besteht darin, dass man 2 der 3 Masszahlen V, F, M vorgibt und die Extrema der dritten aufsucht. Diese Methode hat bis jetzt nur in wenigen Spezialfällen zum Ziel geführt. Hier zeigt sich nun ein Ausweg: Man führt irgend zwei Hilfsgrössen a, b ein, die für konvexe Körper von Bedeutung sind, und bestimmt hernach diejenigen Körper, für welche V, F, M extremale Werte annehmen. Solche Grössen sind beispielsweise Durchmesser und Dicke für allgemeine konvexe Körper, Länge oder Poldistanz und Äquatorradius, Länge der erzeugenden Meridiankurve und Fläche des Meridianschnittes für konvexe Rotationskörper.

Für letztere gelingt es nun, mindestens unscharfe Bildränder zu erhalten, was unter anderem bedeutet, dass neben den schon bekannten noch weitere Relationen zwischen den Masszahlen bestehen müssen. In der vorliegenden Arbeit werden zwei verschiedene Ansätze ausgewertet.

A. Wir betrachten diejenige Teilmenge $\mathfrak{M}_1$ aller konvexen Rotationskörper, deren Individuen feste Länge oder Poldistanz l und festen Äquatorradius r aufweisen. Diese Rotationskörper finden in einem festen Zylinder mit den charakteristischen Massen l und r Platz, und zwar berühren sie Boden und Deckel wenigstens einpunktig, den Mantel mindestens in einer Kreislinie. Unter ihnen besitzt der Zylinder trivialerweise die grössten, der symmetrische Doppelkegel aber die kleinsten Masszahlen. Man berechnet (mit Majuskeln bezeichnen wir fortan Maxima, mit Minuskeln Minima):

$$\begin{aligned} V &= \pi r^2 l; & F &= 2 \pi r (r + l); \\ v &= \frac{\pi r^2 l}{3}; & f &= \pi r \sqrt{l^2 + 4 r^2}; \\ M &= \pi (l + \pi r); \\ m &= \pi \left[l + \pi r - 2 r \cdot \arctg \left(\frac{l}{2 r} \right) \right]. \end{aligned}$$
 (2)

Mit Hilfe der Substitution $2r = l \cdot \operatorname{tg} \varphi$ folgt weiter:

$$\begin{aligned} x &= \frac{8 \sin \varphi}{(\pi \sin \varphi + 2 \cos \varphi)^2}; & X &= \frac{2 \sin \varphi (\sin \varphi + 2 \cos \varphi)}{(\cos \varphi + \sin \varphi \cdot \varphi)^2}; \\ y &= \frac{32 \cos \varphi \sin^2 \varphi}{(\pi \sin \varphi + 2 \cos \varphi)^3}; & Y &= \frac{96 \cos \varphi \cdot \sin^2 \varphi}{(\cos \varphi + \sin \varphi \cdot \varphi)^3}. \end{aligned}$$
 (3)

$0 \leq \varphi \leq \pi/2$.

Die Bildpunkte von $\mathfrak{M}_1$ liegen also innerhalb oder höchstens auf dem Rande eines festen Rechtecks mit achsenparallelen Seiten, wobei ausdrücklich festzuhalten

¹ Vergleiche H. HADWIGER, Über eine fehlende Ungleichung in der Theorie der konvexen Körper, *El. Math.* 2, Nr. 3 (1947).

ist, dass die Ecken gemäss unserer Konstruktion nicht Bildpunkte sind (Abb. 1).

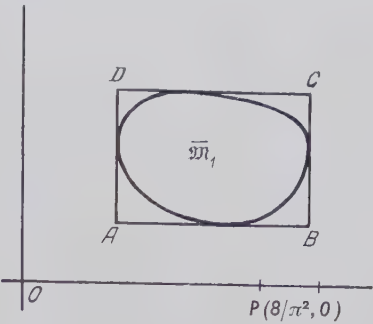


Abb. 1.

Wollen wir nun das Bild der ganzen Menge $\mathfrak{M}$ aller konvexen Rotationskörper von beliebigem l und r erhalten, so haben wir nur φ das Intervall $0 \leq \varphi \leq \pi/2$ durchlaufen zu lassen und die Vereinigungsmenge der so erzeugten unendlichen Folge von Rechtecken zu bestimmen¹.

Die Bildrandstücke PQ und QO sind bekannt². Also brauchen wir uns nur noch mit dem Stück OP zu befassen³. Nun berechnet man:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \frac{16 [1 + \sin^2 \varphi - \pi/4 \cdot \sin (2 \varphi)]}{(\pi \sin \varphi + 2 \cos \varphi)^3}; & \dot{x}(0) &= 2; & \dot{x}(\pi/2) &= 32/\pi^3 \\ \dot{y} &= \frac{32 \sin \varphi^2 (4 \cos \varphi - \pi \sin \varphi)}{(\pi \sin \varphi + 2 \cos \varphi)^4}; & \dot{y}(0) &= 0; & \dot{y}(\pi/2) &= -32/\pi^3 \end{aligned}$$

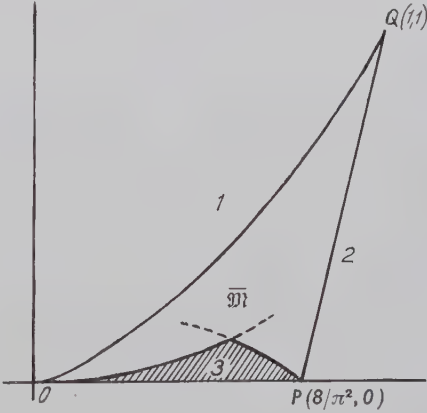


Abb. 2.

- 1 Kappenkörperkurve 2 Kurve der symmetrischen Kugelzonen
3 unscharfer Rand

$\dot{x}$ ist im ganzen Intervall $0 \leq \varphi \leq \pi/2$ positiv; also wächst x monoton.

$\dot{y}$ besitzt noch genau eine Nullstelle für $\operatorname{tg} \varphi^* = 4/\pi$; deshalb weist y genau ein nichttriviales Maximum auf.

¹ Wegen der Invarianz von (3) gegenüber Ähnlichkeit sind wirklich alle konvexen Rotationskörper erfasst worden!

² T. BONNESEN und W. FENCHEL, *Theorie der konvexen Körper*. Vgl. Abb. 2. – H. HADWIGER, *Beweis einer Extremaleigenschaft der symmetrischen Kugelzone*, *Portugalliae Mathematica* 7, Fasc. 2 (1948). – G. BOL, *Beweis einer Vermutung von Muikowski*, *Abh. math. Seminar der Hamischen Universität* 15 (1943).

³ Dass ein solches existieren muss, hat wohl zuerst H. HADWIGER bemerkt.

⁴ $\dot{} = d/d\varphi$.

Der Punkt A beschreibt also eine Kurve, die bei O waagrecht beginnt, genau einen Scheitel in bezug auf die x -Achse durchläuft und sodann bei P mit der Steigung $dy/dx = -1$ einmündet.

Bei dieser Sachlage wird, wie man sofort erkennt, der gesuchte unscharfe Bildrand beschrieben: In der Umgebung von O durch die Bahnkurve des Punktes B ; in der Umgebung von P durch die Bahnkurve des Punktes A (Abb. 2). Dieser innere Rand wie auch der äussere liessen sich übrigens mit Hilfe von (3) genau diskutieren.

B. Wir betrachten jetzt diejenige Teilmenge $\mathfrak{M}_2$ aller konvexen Rotationskörper, deren Individuen feste Länge oder Poldistanz l und feste Länge der erzeugenden Meridiankurve L aufweisen. Es gelten folgende Hilfs-sätze:

- I. Das grösste Volumen V besitzen Rotationskörper, die durch Rotation einer elastischen Linie entstehen¹.
- II. Das kleinste Volumen v besitzen:
im Intervall $l \leq L \leq 4l/3$ Zylinder,
im Intervall $4l/3 < L < \sqrt{2}l$ spez. Kegelstümpfe,
im Intervall $\sqrt{2}l \leq L < \infty$ Kegel².
- III. Die grösste Oberfläche F besitzen die Rotationskörper von an der x -Achse aufgehängten Kettenlinien mit einer Länge aus dem Intervall $l \leq L < \infty$ ³.
- IV. Die kleinste Oberfläche f besitzen Kegelstümpfe².
- V. Das grösste Integral der mittleren Krümmung M besitzen symmetrische Doppelkegel⁴.
- VI. Das kleinste Integral der mittleren Krümmung m besitzen Zylinder⁴.

Die Masszahlen lauten:

$$\text{II. } l \leq L \leq 4l/3 \rightarrow v_1 = \frac{\pi l}{4} (L-l)^2, \quad (4)$$

$$4l/3 < L < \sqrt{2}l \rightarrow v_2 = \frac{\pi l}{48} (3L^2 - 4l^2),$$

$$\sqrt{2}l \leq L < \infty \rightarrow v_3 = \frac{\pi l}{12} \left(\frac{L^2 - l^2}{L} \right)^2.$$

$$\text{III. } 0 \leq \gamma < \infty; \quad F = \frac{\pi l^2}{8\gamma^2} [\text{Si}(2\gamma) - 2\gamma];$$

$$L = \frac{l \cdot \text{Si} \gamma}{\gamma}. \quad (5)$$

$$\text{IV. } l \leq L < \infty; \quad f = \frac{\pi}{2} (L^2 - l^2). \quad (6)$$

$$\text{V. } 0 \leq \psi \leq \pi/2; \quad M = \pi l (\text{tg} \psi \cdot \psi + 1);$$

$$L = l \cdot \sec \psi \quad (7)$$

$$\text{VI. } l \leq L < \infty; \quad m = \pi \left[\frac{\pi}{2} (L-l) + l \right]. \quad (8)$$

Durch Kombination von (4), (6) und (7) gewinnt man ein Stück der Bahnkurve des Punktes A in Parameterdarstellung, nämlich:

$$x = \frac{2 \sin^2 \psi}{(\cos \psi + \sin \psi \cdot \psi)^2}; \quad y_1 = \frac{4 \sin^4 \psi \cdot \cos \psi}{(\cos \psi + \sin \psi \cdot \psi)^3}.$$

$$\pi/4 \leq \psi \leq \pi/2. \quad (9)$$

[Mit Rücksicht auf das Teilintervall für L in (4) und gemäss (7).]

¹ Vergleiche E. CZUBER, *Vorlesungen über Differential- und Integralrechnung*, 2, 5. Abschnitt.

² H. BIERI, *Zwei Minimum-Maximum-Probleme über konvexe Rotationskörper*, *El. Math.* 9, Nr. 3 (1954).

³ Vergleiche O. BOLZA, *Vorlesungen über Variationsrechnung*, und A. KNESER, *Lehrbuch der Variationsrechnung*.

⁴ H. BIERI, *Ein Minimum-Maximum-Problem über konvexe Rotationskörper*, *Commentarii math. helv.* 28, Fasc. 2 (1954).

⁵ Das komplizierte V brauchen wir zum Nachweis des inneren Randes nicht!

Weiter benötigt man:

$$\dot{x} = \frac{4 \sin \psi \cdot \cos^2 \psi}{(\cos \psi + \sin \psi \cdot \psi)^3}; \quad \dot{x}(\pi/2) = 0!$$

$$\dot{y} = \frac{4 \sin^3 \psi [4 \cos^3 \psi + \sin \psi \cos^2 \psi \cdot \psi - \sin^2 \psi \cos \psi - \sin^3 \psi \cdot \psi]}{(\cos \psi + \sin \psi \cdot \psi)^4}.$$

Es lässt sich beweisen, dass $\dot{y}$ ausser für $\psi = 0$ noch genau eine Nullstelle aufweist, die nicht näher untersucht zu werden braucht¹. Die Bahnkurve von A mündet in P mit der Steigung $dy/dx = -\infty$!

Es wäre durchaus möglich, aus (5), (8) und (4) die Bahnkurve des Punktes B zu kombinieren². Wir wollen diesen Rechnungsaufwand unterlassen und uns mit der Feststellung zufriedengeben, dass vermittels des zweiten, anspruchsvolleren Ansatzes in der linksseitigen Umgebung von P eine wesentliche Verbesserung erzielt werden konnte³ (Abb. 3).

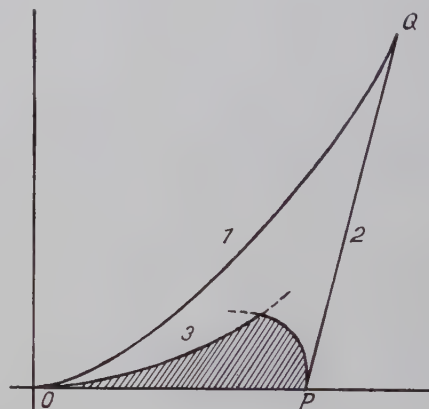


Abb. 3.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass im Blaschke-Diagramm über der x -Achse ein von Rotationskörperbildpunkten freies Gebiet existiert. Die noch fehlenden Beziehungen zwischen den 3 Masszahlen können natürlich erst angegeben werden, wenn der exakte Bildrand bekannt ist⁴.

H. BIERI

Bern, den 18. August 1954.

Summary

It is shown that over the distance $0 \leq X \leq 8/\pi^2$ in the diagram, there is a region which is free from picture points («Bildpunkten») of the convex rotation bodies. This assertion is based on two different groupings of the convex rotation bodies into troops, namely at constant length l and constant radius of the equator r , and at constant l and constant length of the resulting meridial curve L . From this, new relations like between the measurements of the convex rotation bodies follow.

¹ Dies wegen der Überschneidung der Bahnkurve von A durch die Bahnkurve von B .

² Man müsste in (7) M durch L ausdrücken, hernach gemäss (5) den Parameter γ einführen und bekäme dann eine Parameterdarstellung sämtlicher Kurven mit γ als Parameter.

³ Letztthin ist, gestützt auf Resultate von H. HADWIGER, in der Umgebung von P ein neuer, unerwarteter Effekt festgestellt worden. Eine diesbezügliche Publikation wird erscheinen.

⁴ Es ist bemerkenswert, dass mit einfachen Hilfsmitteln Aussagen über das ganze Bild von $\mathfrak{M}$ gemacht werden können. Die Bedeutung dieser Teilresultate wäre erheblich grösser, wenn der exakte Bildrand nicht schon teilweise bekannt wäre. Die gleiche Situation hat sich im allgemeinen Problem durch Einführung von Dicke und Durchmesser ergeben, wo leider nicht einmal das längstbekannte unscharfe Randstück $X \leq 1$ ($M^2 - 4\pi F \geq 0$) verbessert werden konnte.

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acy lanid

Cedil anid

Digil anid

Scillaren

Strophosid



S A N D O Z A . G .

Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

Reihe der experimentellen Biologie

Pflanzliche Infektionslehre

Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenpathologie. Von Prof. Dr. E. GÄUMANN, ETH., Zürich.
681 Seiten mit 467 Figuren (2. Auflage 1951). Ganzleinen Fr. 46.30.

Einführung in die physiologische Embryologie

Von Prof. Dr. F. E. LEHMANN, Universität Bern. 414 Seiten mit 132 Figuren
und 17 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 39.50.

Die Signalübermittlung im Nerven

Von Prof. Dr. A. VON MURALT, Universität Bern. 354 Seiten mit 132 Figuren,
3 mehrfarbigen Tafeln und 24 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 43.70.

Die Pilze

Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Von Prof. Dr. ERNST
GÄUMANN, ETH., Zürich. 382 Seiten mit 440 Figuren (1949). Ganzleinen Fr. 39.50.

Grundriss zu einer Balneobiologie der Thermen

Von Prof. Dr. VALE VOUK, Universität Zagreb. 88 Seiten mit 22 Figuren (1950).
Ganzleinen Fr. 14.55.

Vergleichende Physiologie

in 6 Bänden. Von Prof. Dr. W. VON BUDDENBROCK, Universität Mainz.

Band I: *Physiologie der Sinnesorgane*. 504 Seiten mit 256 Figuren (1952). Ganzleinen Fr. 45.75. — Band II:
Physiologie des Nervensystems. 396 Seiten mit 183 Figuren (1953). Ganzleinen Fr. 38.50. — Band III: *Ernährungs-
physiologie*. Befindet sich in Vorbereitung. Band IV: *Hormone*. 492 Seiten, 115 Figuren und 106 Tabellen.
(1950) Ganzleinen Fr. 49.40. — Die Bände V und VI befinden sich ebenfalls in Vorbereitung.

Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen

Von Prof. Dr. P. BUCHNER, vormalig Universität Leipzig. 771 Seiten mit 336 Figuren und 3 Tafeln.
(1953) Ganzleinen Fr. 66.50.

Planen und Auswerten von Versuchen

Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Von Prof. Dr. ARTHUR LINDER,
Professor für mathematische Statistik an der Universität Genf und an der Eidgenössischen Technischen
Hochschule in Zürich. 182 Seiten mit 9 Figuren, Ganzleinen Fr. 21.—. (1953).

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

Birkhäuser Verlag · Basel/Stuttgart

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acy lanid

Cedilanid

Digilanid

Scillaren

Strophosid



S A N D O Z A . G .

Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

Reihe der experimentellen Biologie

Pflanzliche Infektionslehre

Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenpathologie. Von Prof. Dr. E. GÄUMANN, ETH., Zürich.
681 Seiten mit 467 Figuren (2. Auflage 1951). Ganzleinen Fr. 46.30.

Einführung in die physiologische Embryologie

Von Prof. Dr. F. E. LEHMANN, Universität Bern. 414 Seiten mit 132 Figuren
und 17 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 39.50.

Die Signalübermittlung im Nerven

Von Prof. Dr. A. VON MURALT, Universität Bern. 354 Seiten mit 132 Figuren,
3 mehrfarbigen Tafeln und 24 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 43.70.

Die Pilze

Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Von Prof. Dr. ERNST
GÄUMANN, ETH., Zürich. 382 Seiten mit 440 Figuren (1949). Ganzleinen Fr. 39.50.

Grundriss zu einer Balneobiologie der Thermen

Von Prof. Dr. VALE VOUK, Universität Zagreb. 88 Seiten mit 22 Figuren (1950).
Ganzleinen Fr. 14.55.

Vergleichende Physiologie

in 6 Bänden. Von Prof. Dr. W. VON BUDDENBROCK, Universität Mainz.

Band I: *Physiologie der Sinnesorgane*. 504 Seiten mit 256 Figuren (1952). Ganzleinen Fr. 45.75. – Band II: *Physiologie des Nervensystems*. 396 Seiten mit 183 Figuren (1953). Ganzleinen Fr. 38.50. – Band III: *Ernährungsphysiologie*. Befindet sich in Vorbereitung. Band IV: *Hormone*. 492 Seiten, 115 Figuren und 106 Tabellen. (1950) Ganzleinen Fr. 49.40. – Die Bände V und VI befinden sich ebenfalls in Vorbereitung.

Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen

Von Prof. Dr. P. BUCHNER, vormals Universität Leipzig. 771 Seiten mit 336 Figuren und 3 Tafeln.
(1953) Ganzleinen Fr. 66.50.

Planen und Auswerten von Versuchen

Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Von Prof. Dr. ARTHUR LINDER,
Professor für mathematische Statistik an der Universität Genf und an der Eidgenössischen Technischen
Hochschule in Zürich. 182 Seiten mit 9 Figuren, Ganzleinen Fr. 21.–. (1953).

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

Birkhäuser Verlag · Basel/Stuttgart